

Impacto da microencapsulação na estabilidade do corante natural obtido a partir dos subprodutos do morango e do mirtilo

Joana Isabel Cecílio Gomes

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador(es): Doutora Margarida Gomes Moldão Martins
Doutora Maria do Carmo Martins Serrano

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Paula Gomes da Conceição Sequeira Esteves, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P;
Doutora Maria do Carmo Martins Serrano, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível com a colaboração e apoio de várias pessoas, às quais quero deixar o meu profundo agradecimento:

À Doutora Carmo Serrano, minha orientadora, pela oportunidade que me deu para a concretização deste trabalho, pelo o apoio, orientação, disponibilidade, ajuda, incentivo, partilha de conhecimentos científicos, correções e sugestões que foram imprescindíveis para a execução deste trabalho.

À Professora Margarida Moldão, também minha orientadora, pela igual disponibilidade, apoio, esclarecimento de dúvidas, ensinamentos transmitidos, pela ajuda no tratamento de resultados, críticas construtivas e correções.

À Professora Conceição Oliveira e à Ana Castanho do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa pela realização das análises de LC-MS/MS.

À Fernanda Balsemão pela simpatia, amizade, boa disposição e pelo auxílio prestado sempre que necessário.

A todos os meus colegas e amigos do ISA que me acompanharam desde o início do meu percurso académico, em especial à Sara Castro, Mara Mota e Rita Silva principalmente pela grande amizade e por todos os momentos que partilhamos juntas.

Aos meus pais pelo amor e carinho incondicionais, pelas palavras de incentivo e apoio durante todas as fases da minha vida.

A todos aqueles que não referi mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

Os frutos vermelhos como o morango e o mirtilo dada a sua elevada perecibilidade nem sempre podem ser comercializáveis para fresco, podendo constituir matéria-prima para extração de corantes naturais para fins alimentares. Estes frutos têm na sua constituição antocianinas que são pigmentos responsáveis pela cor vermelha ou azul e que apresentam elevada atividade antioxidante. Contudo, a sua utilização como corantes tem sido limitada devido à baixa estabilidade durante o processamento e armazenamento. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da luz e da temperatura nas características dos extratos aquosos de morango e de mirtilo bem como o efeito da microencapsulação por liofilização e por atomização na estabilidade da cor, utilizando a inulina como agente encapsulante. Os extratos e os microencapsulados de morango apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e capacidade antioxidante que os extratos e microencapsulados de mirtilo. A análise dos resultados permitiu observar que a temperatura, bem como a presença de luz provocam uma degradação das antocianinas e uma modificação na cor dos extratos aquosos de morango e de mirtilo ($t_{1/2}$ = 24 e 22 dias, respetivamente, na presença de luz). As antocianinas maioritárias identificadas por LC-MS/MS (pelargonidina-3-O-glucose, delphinidina-ferúlica e cianidina-ferúlica no extrato de morango e malvidina-3-O-glucose, malvidina-3-O-pentose e malvidina -3-acetilglucose no extrato de mirtilo) revelaram que a luz tem um efeito mais significativo do que a temperatura na degradação da cor. A microencapsulação por atomização e por liofilização produz microcápsulas com morfologias e tamanhos diferentes, permitindo manter a sua cor original ao longo do tempo de exposição à luz, contrariamente ao que se verifica com os extratos aquosos. Os subprodutos de morango e de mirtilo apresentam potencial para serem aplicados como corantes naturais, sendo a microencapsulação um processo promissor para melhorar a sua estabilidade de modo a serem incorporados em alimentos expostos à luz.

Palavras-chave: antocianinas, cor, luz, temperatura, liofilização, atomização

Abstract

Small fruits like strawberry and blueberry can't often be marketable for fresh because of their high perishability, and may constitute raw material for extraction of natural dyes for food purposes. These fruits have in their constitution anthocyanins that are pigments responsible for the red or blue color and have high antioxidant activity. However, their use as colorants has been limited due to the low stability during the processing and storage of foods. The aim of this work was to study the effect of light and temperature on the characteristics of aqueous extracts of strawberry and blueberry as well as the effect of microencapsulation by freeze-drying and spray-drying on color stability using inulin as wall material. Strawberry extracts and microencapsulates showed higher total phenolic compounds, total anthocyanins and antioxidant capacity than extracts and microencapsulates of blueberry. The analysis of the results shows that temperature as well as the presence of light causes a degradation of anthocyanins and the colour of the aqueous extracts of strawberry and blueberry ($t_{1/2}$ = 24 e 22 days, respectively, in the presence of light). The major anthocyanins identified by LC-MS / MS (pelargonidin-3-O-glucose, delphinidin-ferulic and cyanidin-ferulic in strawberry extract and malvidine-3-O-glucose, malvidine-3-O-pentose and malvidin-3-acetylglucose in blueberry extract) revealed that light has a more significant effect than temperature on color degradation. Microencapsulation by spray-drying and by freeze-drying produces microcapsules with different morphologies and sizes, allowing to maintain their original color throughout the time of exposure to light, contrary to what happens with the aqueous extracts. Strawberry and blueberry by-products have the potential to be applied as natural dyes, and microencapsulation is a promising process to improve their stability so that they can be incorporated into foods exposed to light.

Key words: anthocyanins, colorant, temperature, light, freeze-drying, spray-srying

Índice

Introdução e Objetivos.....	1
I. Enquadramento Teórico	3
1. Valorização de subprodutos agro-industriais	3
2. O Morango	5
3. O Mirtilo	6
4. Produção de morangos e de mirtilos	6
5. Compostos fenólicos	7
6. Fatores que afetam a estabilidade das antocianinas	12
7. Microencapsulação.....	15
7.1. Agente encapsulante	16
7.2. Microencapsulação por atomização.....	19
7.3. Microencapsulação por liofilização.....	21
II. Desenvolvimento Experimental	23
8. Material vegetal utilizado	23
9. Processos de extração de antocianinas.....	23
10. Microencapsulação de antocianinas	24
10.1. Preparação dos extrato de morango e mirtilo para microencapsulação	24
10.2. Condições de secagem.....	25
11. Avaliação da estabilidade	25
11.1. Termo-estabilidade	25
11.2. Foto-estabilidade	26
12. Métodos analíticos.....	27
12.1. Identificação dos compostos por LC-MS/MS	27
12.2. Métodos espectrofotométricos para avaliar a capacidade antioxidante e o teor de antocianinas totais dos extratos de morango e de mirtilo.....	28
12.2.1. Método de Folin Ciocalteau	28
12.2.2. Método de redução do ião ferro (FRAP)	29
12.2.3. Método de captação de radicais livres (DPPH)	30
12.2.4. Método do pH diferencial	31
12.3. Parâmetros da cor	32
12.4. Análise morfológica das microcápsulas	33
12.5. Métodos estatísticos	33
III. Resultados e Discussão	35
13. Estudo do processo de extração de antocianinas.....	35
14. Avaliação da estabilidade	37
14.1. Termo-estabilidade	37

14.2. Foto-estabilidade	41
15. Identificação dos compostos por LC-MS/MS	46
16. Avaliação da capacidade antioxidante e do teor de antocianinas totais	54
17. Análise morfológica das microcápsulas	56
IV. Conclusões.....	60
V. Bibliografia	62
VII. Anexos.....	70

Índice de figuras

Figura 1 – Morfologia do morango.....	5
Figura 2 – Mirtilo.....	6
Figura 3 – Estrutura molecular do fenol.....	7
Figura 4 – Estrutura química das principais classes de flavonóides.	9
Figura 5 – Estrutura química das antocianidinas mais comuns	11
Figura 6 – Estrutura química das várias antocianinas existentes em meio aquoso.....	13
Figura 7 – Processos de extração de antocianinas à temperatura ambiente em placa magnética (t= 13, 30, 45, 60 e 70 min), em banho de ultrassons (t=5, 10, 15, 20, 25 min) e em banho-maria (t=15, 30, 45, 60 e 70 min).....	24
Figura 8 - Curva de calibração para quantificação dos compostos fenólicos totais.....	29
Figura 9 – Curva de calibração para o método FRAP.....	30
Figura 10 – Central Composite Rotatable Design para dois fatores X_1 e X_2	34
Figura 11 – Valores absorvância a 500nm para o extrato de morango em função do tempo para o processo de extração em banho de ultrassons (US), em banho-maria (BM) e em placa de agitação à temperatura ambiente (T.amb).....	35
Figura 12 – Superfície de resposta para o teor de antocianinas totais em função da temperatura e tempo de tratamento: (A) morango e (B) mirtilo	39
Figura 13 – Superfície de resposta para o parâmetro C^* em função da temperatura e tempo de tratamento: (A) morango e (B) mirtilo.....	39
Figura 14 – Superfície de resposta para o parâmetro h^0 em função da temperatura e tempo de tratamento: (A) morango e (B) mirtilo.....	39
Figura 15 – Superfície de resposta para o parâmetro L em função da temperatura e tempo de tratamento para o extrato aquoso de mirtilo.....	40
Figura 16 – Variação do teor de antocianinas totais em função do tempo de exposição à luz	41
Figura 17 – Variação do parâmetro de cor L^* dos extratos de morango e de mirtilo em função do tempo de exposição à luz	42
Figura 18 – Variação do parâmetro de cor C^* dos extratos de morango e de mirtilo em função do tempo de exposição à luz	42
Figura 19 – Variação do parâmetro de cor h^0 dos extratos de morango e de mirtilo ao longo do tempo de exposição à luz	43
Figura 20 – Variação dos parâmetros de cor L^* , C^* e h^0 dos microencapsulados de morango liofilizados em função do tempo de exposição à luz	44
Figura 21 – Valor de absorvância a 500 nm das antocianinas, presentes nos extratos de morango e de mirtilo, em função do tempo de exposição à luz.	45

Figura 22 – Variação da área das antocianinas identificadas em função do tempo de retenção (min) nos extratos aquosos de morango após ensaios de termo-estabilidade	48
Figura 23 – Variação da área das antocianinas identificadas em função do tempo de retenção (min) nos extratos aquosos de morango após ensaios de foto-estabilidade	48
Figura 24 – Variação da área das antocianinas identificadas em função do tempo de retenção (min) nos extratos aquosos de mirtilo após ensaios de termo-estabilidade.....	50
Figura 25 – Variação da área das antocianinas identificadas em função do tempo de retenção (min) nos extratos aquosos de mirtilo após ensaios de foto-estabilidade.....	51
Figura 26 – Varrimento a 500 nm dos extrato aquosos de morango submetidos a diferentes binómios de temperatura e de tempo de tratamento.....	52
Figura 27 –Varrimento a 500 nm dos extratos aquosos de morango ao longo do tempo de exposição à luz.....	52
Figura 28 –Varrimento a 500 nm dos extratos aquosos de mirtilo submetido a diferentes binómios de temperatura e de tempo de tratamento.....	53
Figura 29 –Varrimento a 500 nm dos extratos aquosos de mirtilo ao longo do tempo de exposição à luz.....	53
Figura 30 – Teor de compostos fenólicos totais (A), teor de antocianinas totais (B) e atividade antioxidante pelos métodos FRAP (C) e DPPH (D) do extrato aquoso, do liofilizado e dos microencapsulados de morango e de mirtilo	54
Figura 31 – Imagens obtidas por SEM das microcápsulas de morango formadas por atomização. Ampliação (A): 500 x (B): 2000 x	57
Figura 32 – Imagens obtidas por SEM das microcápsulas de morango formadas por liofilização. Ampliação (A): 500 x (B): 2000 x.....	57
Figura 33 – Imagens obtidas por SEM das microcápsulas de mirtilo formadas por liofilização. Ampliação (A): 1000 x (B): 2000 x	58
Figura 34 – Distribuição do tamanho das microcápsulas de morango formadas por atomização.....	58
Figura 35 – Distribuição do tamanho das microcápsulas de morango formadas por liofilização.....	59

Índice de tabelas

Tabela 1 – Matriz codificada e decodificada para os ensaios de termo-estabilidade.....	26
Tabela 2 – Equações dos modelos ajustados aos valores experimentais para o teor de antocianinas totais e parâmetros da cor (C^* , h° , L) de morango e mirtilo em função da temperatura e tempo de tratamento	38
Tabela 3 – Variação da cor resultante dos extratos de morango e de mirtilo em função da temperatura ($^\circ\text{C}$) e do tempo de tratamento (min)	40
Tabela 4 – Cor resultante dos extratos de morango e de mirtilo em função do tempo de exposição à luz.....	43
Tabela 5 – Cor resultante dos microencapsulados de morango liofilizados em função do tempo de exposição à luz.....	44
Tabela 6 – Equações de regressão, coeficiente de regressão (r^2) e valores da constante de velocidade de degradação (K_d) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) ao longo do tempo de exposição à luz dos extratos de morango e de mirtilo	46
Tabela 7 – Antocianinas e seus derivados identificados nos extratos aquosos de morango após ensaios de termo-estabilidade	47
Tabela 8 – Antocianinas e seus derivados identificados, nos extratos aquosos de morango, após ensaios de foto-estabilidade	47
Tabela 9 – Antocianinas e seus derivados identificados, nos extratos aquosos de mirtilo, após ensaios de termo-estabilidade	49
Tabela 10 – Antocianinas e seus derivados identificados, nos extratos do mirtilo, após ensaios de foto-estabilidade	50

Introdução e Objetivos

A indústria agro-alimentar produz uma grande quantidade de subprodutos que muitas vezes são rejeitadas ao longo da cadeia e que representam um sério problema económico e ambiental. Contudo, alguns subprodutos podem constituir uma alternativa, com elevado valor nutricional, para serem usados de um modo sustentável no desenvolvimento de novos produtos.

Os frutos vermelhos como o mirtilo e o morango muitas vezes não podem ser comercializáveis para fresco devido à sua elevada perecibilidade, podendo ser utilizados como matéria-prima para a extração de aditivos alimentares como corantes naturais, devido à presença de antocianinas. As antocianinas são um grupo de pigmentos naturais hidrossolúveis que pertencem ao subgrupo dos flavonoides e são responsáveis pelas cores vermelha, roxa e azul dos frutos e vegetais.

Atualmente tem-se verificado uma tendência para o desenvolvimento de corantes de origem natural para a substituição dos corantes sintéticos que podem apresentar problemas para a saúde. Um outro aspeto que tem impulsionado este aumento prende-se com o facto dos corantes naturais possuírem um elevado poder antioxidante que contribui para a prevenção do aparecimento de diversas doenças. No entanto, as antocianinas são muito suscetíveis à degradação o que tem limitado a sua utilização como corantes naturais, sendo a cor destes compostos afetada pela temperatura, presença de luz, oxigénio, iões metálicos, atividade enzimática e outros fatores.

A microencapsulação é um processo que tem sido utilizado para melhorar a estabilidade das antocianinas para que possam ser incorporadas em produtos alimentares como corantes naturais. Este processo consiste em reter uma substância no interior de uma matriz que vai proteger o composto de interesse das condições a que é sujeito durante o processamento e armazenamento dos alimentos em que são aplicados.

Este trabalho teve como objetivos (i) estudar o processo de extração da matéria corante de morango e de mirtilo (ii) estudar o efeito da temperatura e da luz na estabilidade da matéria corante (iii) identificar os compostos termo e foto-degradados por LC MS/MS (iv) estudar o efeito da microencapsulação por liofilização e por atomização na estabilidade da cor,

utilizando inulina como agente encapsulante e (iv) analisar a atividade funcional e a morfologia das microcápsulas obtidas.

Do presente trabalho resultou uma publicação e uma apresentação oral no V Colóquio Nacional da Produção de Pequenos Frutos (Anexo I).

I. Enquadramento Teórico

1. Valorização de subprodutos agro-industriais

A indústria agro-alimentar gera uma grande quantidade de subprodutos que são muitas vezes considerados “lixo” (Galanakis, 2015). Segundo Gustavsson, *et al.* (2011) as perdas no sector primário representam uma percentagem considerável do total de subprodutos gerados ao longo da cadeia. Estas perdas ocorrem devido a danos mecânicos ocasionados durante as operações de colheita, condições climáticas adversas, doenças e pragas que afetam as culturas e fatores económicos (regulamentos e padrões estéticos e de qualidade exigidos pelo mercado). Podem também ocorrer devido à falta de cuidado no manuseamento dos alimentos, bem como à falta de comunicação ao longo da cadeia de abastecimento que consequentemente leva a excedentes de produção (Galanakis, 2015).

Por isso, a valorização de subprodutos surge, não só como uma necessidade, mas também como uma oportunidade para a obtenção de novos produtos de valor acrescentado (Pintado e Teixeira, 2015). O termo subproduto é cada vez mais empregue na indústria alimentar cuja designação pretende transmitir que os “desperdícios alimentares” podem constituir substratos para a obtenção de nutrientes e compostos funcionais com viabilidade no desenvolvimento de novos produtos com valor de mercado (Galanakis, 2012).

A maioria dos subprodutos de frutos e vegetais é depositada em aterros sanitários, ou incorporada nos solos como fontes de matéria orgânica, o que envolve alguns riscos de propagação de doenças. Estes subprodutos contêm elevadas concentrações de nutrientes e água, e conseguem suportar o crescimento microbiano e fermentação, podendo causar odores e outros problemas ambientais. Por outro lado, estes subprodutos podem ser usados na alimentação animal, mas o seu baixo teor de proteína torna-os inadequados para este fim (Van Dyk, *et al.*, 2013). Outra finalidade para estes subprodutos é a produção de energia através dos processos de gasificação e digestão anaeróbia (Pap, *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, surgiram novos métodos de gestão de subprodutos que têm suscitado um maior interesse e que se focam na recuperação e reutilização de compostos de elevado valor para uso na alimentação humana (Galanakis, 2015).

Os frutos vermelhos, como o morango e o mirtilo, possuem um elevado teor de compostos fenólicos, antioxidantes e fibras, podendo os seus subprodutos ser recuperados para

diversos fins na indústria alimentar ou outras (Mirabella, *et al.*, 2014). Uma aplicação interessante dos subprodutos de morango e de mirtilo é a sua utilização como matéria-prima para a extração de corantes naturais para fins alimentares, devido à presença de antocianinas. O interesse por estes pigmentos tem aumentado nos últimos anos principalmente devido à tendência crescente para o desenvolvimento de corantes alimentares a partir de fontes naturais como alternativa aos corantes sintéticos, e também devido à sua elevada atividade antioxidante que contribui para a prevenção de vários tipos de doenças (Mahdavi *et al.*, 2016), podendo a suplementação de alimentos com estes compostos constituir uma estratégia valiosa para aumentar a sua ingestão.

A conceção de novos produtos alimentares, isto é, a complexidade da matriz e a sua composição em compostos bioativos, requer uma avaliação cuidadosa dos potenciais riscos que podem advir do isolamento de compostos recuperados a partir de subprodutos. Por exemplo, os polifenóis na presença de alguns iões metálicos de transição podem comportar-se como pro-oxidantes. Além disso, também é importante a realização de estudos que avaliem a estabilidade e as interações que ocorrem entre os compostos bioativos e outros ingredientes alimentares durante o processamento e o armazenamento (Schieber, *et al.*, 2001).

A recuperação de componentes de elevado valor a partir de subprodutos envolve várias fases que apresentam crescente complexidade e custo, dependendo do grau de pureza a atingir (Pintado e Teixeira, 2015). A primeira fase do processo de recuperação consiste num pré-tratamento que depende da natureza e estrutura do substrato e tem como objetivo facilitar as operações subsequentes. Segue-se uma fase de separação ou extração das moléculas para obter os compostos alvo. Durante esta fase podem ser arrastados outros compostos não desejados, sendo, deste modo, necessário uma fase de isolamento e/ou purificação. O produto é depois estabilizado para armazenamento por liofilização, atomização ou outro método (Galanakis, 2015; Pintado e Teixeira, 2015).

Segundo Pintado e Teixeira (2015) durante a recuperação ou produção de compostos para aplicação alimentar, devem ser tidos em conta alguns aspetos, tais como: seleção do método de extração de forma a maximizar o rendimento dos compostos-alvo e adequar às exigências do processamento industrial, purificar os ingredientes de alto valor, eliminando impurezas e compostos tóxicos, evitar a deterioração e a perda de funcionalidade durante o processamento e garantir a natureza de grau alimentar do produto final.

A valorização de subprodutos em compostos de elevado valor apesar de ser uma opção atrativa, pode não ser economicamente sustentável, devido ao elevado custo de logística, armazenamento e transporte da matéria-prima, assim como à utilização de processamentos que requerem um elevado consumo energético ou técnicas dispendiosas (Pintado e Teixeira, 2015). Nesse sentido, é fundamental a identificação do tipo e quantidade de resíduos, o potencial de exploração e a localização dos produtores e dos potenciais compradores do produto final. Estas avaliações são necessárias para avaliar a sustentabilidade de todo o processo de recuperação, bem como para evitar o risco de encargos resultantes da transferência de resíduos de um meio para o outro (Mirabella, *et al.*, 2014).

2. O Morango

O morango pertence à família *Rosaceae*, subfamília *Rosoideae* e género *Fragaria*. A maioria dos morangos cultivados pertence à espécie *Fragaria x ananassa* Duch que é um híbrido resultante do cruzamento natural das espécies americanas *F. chiloensis* e *F. virginiana* (Almeida, 2006). O morangueiro é uma planta perene de consistência herbácea com um sistema radicular fasciculado e superficial. O caule é curto, com um formato cilíndrico, onde se inserem folhas trifoliadas em forma de roseta dando origem a um conjunto que se designa vulgarmente por “coroa” (Almeida, 2006). A planta possui uma ou mais coroas a partir da qual se desenvolvem outros órgãos como as folhas, as inflorescências e os estolhos. As inflorescências dão origem a um número variável de flores hermafroditas que são responsáveis pela formação dos frutos. O fruto, é na verdade, um pseudofruto constituído por um receptáculo carnudo sobre o qual se encontram os verdadeiros frutos, os aquénios. No entanto, designa-se por fruto o conjunto formado pelo receptáculo e os aquénios (figura 1) (Palha, 2005; Almeida, 2006).

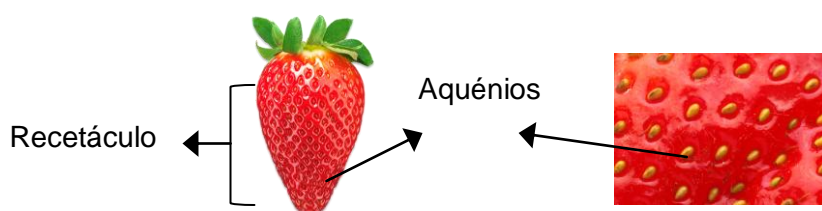


Figura 1 – Morfologia do morango

3. O Mirtilo

O mirtilo (figura 2) pertence à família das *Ericáceas*, subfamília *Vaccinoideae* e género *Vaccinium* que inclui cerca de 450 espécies diferentes. As variedades mais importantes do ponto de vista económico são “Northern e Southern Highbush”, “Lowbush” e “Rabbiteye”. É um fruto de climas temperados nativo do norte do continente Americano, Europa e Ásia (Sousa, 2007). O fruto é uma baga com um tamanho que oscila entre os 7 e os 12 milímetros de diâmetro, caracterizada pela presença de uma estrela de cinco pontas na parte superior (Serrado *et al.*, 2008). A baga apresenta uma pele firme e uma cor azul com tonalidades variando do mais claro para o mais escuro e intenso. A cor azul típica dos mirtilos é influenciada pela presença de uma cera, denominada pruína, que cobre o fruto. No interior encontram-se muitas sementes que contribuem para um sabor menos acentuado e um certo grau de arenosidade (Sousa, 2007). A polpa é succulenta, aromática e de sabor agri-doce (Serrado *et al.*, 2008).



Figura 2 – Mirtilo

4. Produção de morangos e de mirtilos

De acordo com a FAO, os morangos alcançaram, em 2013, um volume de produção que ronda os 8 milhões de toneladas. O maior produtor, a nível mundial, é a Ásia que contribuiu com cerca de 50% da produção mundial, sendo a China e a Turquia os países com maior produção. Na América, produziu-se cerca de 25% do volume mundial, destacando-se como principais produtores os EUA e o México. A Europa contribuiu com cerca de 19%, sendo Espanha o país com maior produção. Os outros continentes são responsáveis por apenas 6% da produção mundial. Em Portugal, segundo o INE, verificou-se um aumento da quantidade produzida de cerca de 13 mil toneladas em 2013 para 15 mil toneladas em 2014, sendo as principais regiões produtoras o Algarve, o Ribatejo e Oeste e o Alentejo. O morango é produzido praticamente durante todo o ano, havendo uma maior oferta na Primavera, entre Abril e Junho (Palha, 2005). De acordo com os dados do INE, Portugal importou mais morangos do que exportou, tanto em 2013 como em 2014, tendo sido

importadas cerca de 16 mil e 17 mil toneladas e exportadas cerca de 3 mil e 5 mil toneladas em 2013 e 2014, respetivamente. A Espanha, Holanda, França, Bélgica e Reino Unido são os principais destinos da produção nacional (Consulai, 2014).

Relativamente aos mirtilos, segundo a FAO, foram produzidos, em 2013, cerca de 421 mil toneladas. A América é o maior produtor contribuindo com cerca de 86% da produção mundial, destacando-se os EUA, o Canadá e o México. A Europa produziu cerca de 13% do volume mundial, sendo a Polónia e a Alemanha os maiores produtores deste fruto. Os outros continentes produziram apenas 1% do volume mundial. De acordo com os dados do INE, Portugal produziu em 2013 perto de 1 500 toneladas de mirtilos e em 2014 cerca de 1 900 toneladas, destacando-se o Alentejo e a zona do Sever do Vouga como as principais regiões produtoras. A sua produção decorre durante os meses de Abril a Agosto, dependendo do tipo de cultivar (Sousa, 2007). A França, Holanda e Bélgica são os mercados onde o mirtilo português tem boa aceitação (Consulai, 2014).

5. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos representam uma das principais classes de metabolitos secundários das plantas e são essenciais para o seu crescimento, reprodução e pigmentação (Robards, *et al.*, 1999). Até ao momento, já foram identificados mais de 8 000 compostos fenólicos e todos eles apresentam uma característica em comum, a presença de um grupo fenol, ou seja, um anel aromático ligado a pelo menos um grupo hidroxilo (figura 3) (Vermerris e Nicholson, 2016). De acordo com a sua estrutura, os compostos fenólicos podem ser divididos em ácidos fenólicos (derivados do ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmico), flavonóides, estilbenos e taninos (Vermerris e Nicholson, 2016).

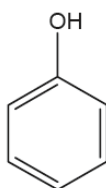


Figura 3 – Estrutura molecular do fenol

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes nos alimentos tem despertado interesse a nível nutricional, uma vez que promove efeitos benéficos para a saúde humana prevenindo o aparecimento de várias doenças, como doenças cardiovasculares, cancro, diabetes, Alzheimer e outras doenças neuro-degenerativas (Huang, *et al.* 2012). A ação

antioxidante está relacionada com a capacidade que estes compostos têm para captar radicais livres prevenindo, assim, a ocorrência de reações de oxidação que podem causar danos nas estruturas celulares (proteínas, lípidos e ADN) que são responsáveis pelo envelhecimento celular. Muitos compostos antioxidantes possuem propriedades anti-inflamatória, antiaterosclerótica, anti-proliferativa, anti-tumoral, antimutagénica, anticarcinogénica e antimicrobiana (Huang, *et al.*, 2012). No entanto, os compostos fenólicos não são os únicos antioxidantes presentes nos alimentos, uma vez que existem outros, como por exemplo a vitamina C, que contribuem para a capacidade antioxidante total. Num estudo realizado por Tulipani *et al.* (2008) a diferentes cultivares de morangos, a vitamina C foi responsável por mais de 30% da capacidade antioxidante, seguindo-se as antocianinas contribuindo com 25% a 40%, sendo o resto atribuído principalmente aos derivados do ácido elágico e aos flavonóis. Contudo, existem referências bibliográficas que afirmam que a vitamina C contribui pouco para a atividade antioxidante do morango e que a mesma é devida sobretudo à presença dos compostos fenólicos (Aaby, *et al.*, 2005). Prior, *et al.* (1998) verificaram que a vitamina C representava entre 0,2 a 2,3% da capacidade antioxidante do mirtilo, consoante a espécie, e que este composto tem pouca influência na atividade antioxidante do mesmo.

A composição em polifenóis é influenciada por vários fatores tais como cultivar, condições edafo-climáticas (solo, luz, temperatura, etc.), práticas culturais e estado de maturação, resultando em frutos com diferentes teores em compostos fenólicos e diferentes capacidades antioxidantes (Giampieri, *et al.*, 2012; Huang, *et al.*, 2012). O teor em compostos fenólicos, segundo diversos estudos realizados, pode variar entre 43 a 273 mg/100 g para o morango fresco e entre 106 a 435 mg/100 g, 295 a 495 mg/100 g, 231 a 961 mg/100 g e 116 a 586 mg/100 g, para as variedades de mirtilo fresco highbush, lowbush, rabbiteye e Southern highbush, respetivamente (Zhao, 2007).

O morango e o mirtilo têm na sua constituição uma vasta diversidade de compostos fenólicos. Num estudo sobre a composição fenólica de pequenos frutos, Huang, *et al.* (2012), identificaram no morango vários ácidos fenólicos incluindo os ácidos gálico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico, cafeico, *p*-cumárico, elágico e cinâmico. O morango é uma das principais fontes de ácido elágico na dieta humana, encontrando-se maiores teores deste composto nas folhas, seguida dos aquénios e por fim na polpa isenta de aquénios (Aaby, 2005). O ácido clorogénico é o principal ácido fenólico presente no mirtilo encontrando-se outros como os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico (Kalt e McDonald, 1996), *p*-hidroxibenzóico e vanílico (Huang, *et al.*, 2012). Relativamente aos taninos, o morango contém na sua composição taninos hidrolisáveis, principalmente elagitaninos e galataninos, e em menor

quantidade taninos condensados ou proantocianidinas (Giampieri, *et al.*, 2012). Os elagitaninos juntamente com as antocianinas representam os principais polifenóis deste fruto (Zhao, 2007). O mirtilo, ao contrário do morango, é caracterizado por conter grandes quantidades de proantocianidinas, essencialmente, procianidinas. Este fruto não contém elagitaninos e, portanto, a sua concentração em ácido elágico é muito baixa (Zhao, 2007). As antocianinas e as proantocianidinas são os principais compostos fenólicos presentes no mirtilo (Huang, 2012).

Flavonóides

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular que apresentam uma estrutura com 15 átomos de carbono, C₆-C₃-C₆, constituída por dois anéis aromáticos (denominados anel A e B) unidos por um heterocíclico que contém um átomo de oxigénio (anel C) (Vermerris e Nicholson, 2009). Estes compostos podem apresentar estruturas muito diferentes que resultam de substituições que ocorrem na sua estrutura básica, tais como, glicosilação, hidrogenação, hidroxilação, metilação e sulfatação (Cook e Samman, 1996). Geralmente, estes compostos não se encontram na natureza na forma livre existindo principalmente na forma glicosilada, ou seja, ligados a açúcares que se encontram preferencialmente unidos ao C₃ e, com menor frequência, ao C₅ e C₇. Às moléculas de flavonóides livres dá-se o nome de agliconas (Aherne e O'Brien, 2002; Cook e Samman, 1996).

Dependendo do estado de oxidação do anel C, os flavonóides são divididos em várias classes, das quais se destacam os flavanóis, flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (figura 4) (Aherne e O'Brien, 2002).

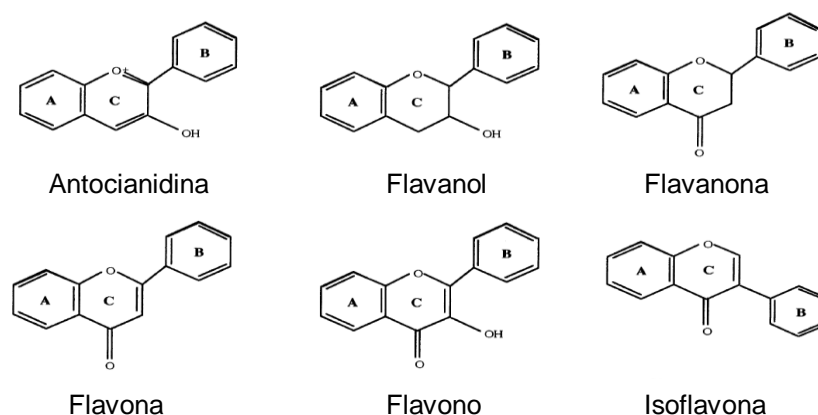


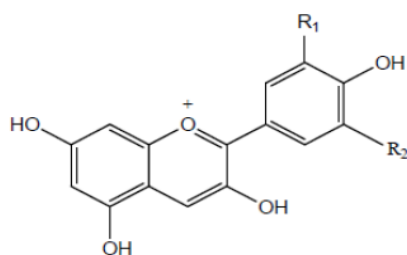
Figura 4 – Estrutura química das principais classes de flavonóides. Fonte: Aherne, *et al.*, 2002

Os flavonóides mais abundantes no morango e no mirtilo são os flavonóis e os flavanóis (Andersen e Markham, 2006). Os glucósidos de quercitina e de canferol são os principais flavonóis existentes no morango (Aaby, *et al.*, 2005). O mirtilo apresenta uma composição em flavonóis muito complexa que inclui vários derivados de quercitina, miricetina e canferol (Andersen e Markham, 2006). Gavrilova, *et al.*, também identificaram derivados de laricitrina e siringetina em várias variedades de mirtilo. Os flavonóis estão maioritariamente localizados na pele do fruto do mirtilo, encontrando-se pequenas quantidades nas sementes e na polpa (Zhao, 2007). No morango estes compostos estão presentes essencialmente nos aquénios (Aaby, *et al.*, 2005). Relativamente aos flavanóis, é possível encontrar no morango a (+) catequina, a (-) epigallocatequina, a (-) epicatequina galato e a (+) galocatequina. Estes flavanóis também foram identificados no mirtilo, excepto a (-) epicatequina galato. Este fruto contém ainda na sua constituição a (-) epicatequina (Andersen e Markham, 2006). Quanto às flavonas, Huang, *et al.*, encontraram no morango a luteína estando esta ausente no mirtilo. Segundo Andersen e Markham (2006) tanto o morango como o mirtilo não contêm flavanonas.

Antocianinas

As antocianinas constituem um grupo de pigmentos naturais hidrossolúveis que são responsáveis pelas cores azul, vermelha e roxa dos frutos, flores e vegetais (Chopra e Panesar, 2010). Estes compostos consistem em antocianidinas ligadas a açúcares sendo os mais comuns a glucose, a galactose, a ramnose e a arabinose. Os resíduos de açúcares podem, por sua vez, ligar-se a ácidos aromáticos e alifáticos sendo os mais frequentes os ácidos cafeico, ferrúlico, *p*-cumárico, acético, oxálico, málico, e malónico. (Rein, 2005). Estruturalmente as antocianinas são glucósidos de polihidroxi ou polimetoxi glicosídicos derivados dos sais de 2-fenil-benzopirílio ou catião flavílio (Andersen e Jordheim, 2006) e diferenciam-se pelo número de grupos hidroxilo presentes na molécula; pelo o grau de metilação destes grupos hidroxilo; pelo número, natureza e localização dos açúcares ligados à molécula e pelo número e natureza das cadeias alifáticas ou aromáticas esterificadas com os açúcares (Chopra e Panesar, 2010).

As antocianinas mais comuns são derivadas de seis antocianidinas: cianidina (Cy), peonidina (Pn), pelargonidina (Pg); malvidina (Mv), petunidina (Pt) e delfinidina (Dp) (Andersen e Jordheim, 2006). Estas agliconas diferem no número de grupos hidroxilo e metoxilo presentes no anel B do catião flavílio (Figura 5) (Rein, 2005).



Antocianidina	R ₁	R ₂
Pelargonidina	H	H
Delfinidina	OH	OH
Cianidina	OH	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 5 – Estrutura química das antocianidinas mais comuns. Fonte: Chopra e Panesar, 2010

Os glúcidos e os grupos acilo que se encontram ligados à aglicona, bem como a localização da ligação influenciam significativamente a estabilidade e reatividade das antocianinas (Rein, 2005). Os grupos hidroxilo e metoxilo também afetam a estabilidade destes compostos, uma vez que a estabilidade diminui com o aumento do número de grupos hidroxilo e aumenta com o aumento do número de grupos metoxilo (Cavalcanti, *et al.*, 2011).

O total de antocianinas encontrado, em vários estudos, no morango fresco varia entre 6 a 102 mg/100 g e nas variedades de mirtilo fresco highbush, lowbush, rabbiteye e southern highbush entre 20 a 269 mg/100 g, 91 a 260 mg/100 g, 13 a 515 mg/100 g e 35 a 823 mg/100 g, respetivamente (Zhao, 2007).

As antocianinas presentes no morango derivam da pelargonidina e da cianidina (Lopes-da-Silva, *et al.*, 2002). Segundo Wrolstad (1976) a Pg 3-glucósido é a principal antocianina encontrada no morango, seguida da Cy 3-glucósido. Na variedade de morangos *Camarosa* foram detetadas outras como a Cy-3-rutinósido, Pg-3-rutinósido e Pg-3,5-diglucósido (Cerezo, *et al.*, 2010). Nas variedades de morango, estudadas por Silva *et al.* (2007), constatou-se que a Pg-3-glucósido em conjunto com a Pg-3-rutinósido e Cy-3-glucósido representavam mais de 95% do total de antocianinas existentes no fruto. Goiffon *et al.*, identificaram a Pg-3-arabinósido como sendo uma das principais antocianinas presentes nas variedades *Senga sengana* e *El santa* representando entre 3,1 a 3,9%, do total de antocianinas. A presença da Cy-3-galactósido foi relatada pela primeira vez por Cerezo, *et al.*, 2010. Silva, *et al.*, (2007), identificaram em cinco variedades de morango vinte e cinco antocianinas, entre as quais várias antocianinas aciladas como a Pg-3-acetilglucósido e a Pg-3-malonilglucósido. Outras antocianinas aciladas encontradas no morango são a Pg-3-(6-malonilglucósido) (Tamura, *et al.*, 1995), a Cy-3-malonilglucósido (Silva, *et al.*, 2007) e a Pg-3-malilglucósido (Lopes-da-Silva, *et al.*, 2002) na variedade *Camarosa*. No estudo de Silva, *et al.*, (2007), também foram identificadas antocianinas condensadas que resultam da

ligação entre a Pg-3-glucósido e flavanóis como a catequina, a epicatequina e a (epi)afzelequina, como por exemplo, a catequina-(4,8) -Pg-3-glucósido, epicatequina-(4,8) -Pg-3-glucósido e a (epi)afzelequina -(4,8) -Pg-3-glucósido.

O perfil em antocianinas do mirtilo é muito complexo e inclui 15 antocianinas que resultam da combinação de cinco agliconas (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina) com três açúcares (glucose, galactose e arabinose) (Rein, 2005). Segundo Wrolstad (1976), as principais antocianinas encontradas no mirtilo (*Vaccinium angustifolium*) por ordem decrescente são a Dp-3-glucósido, Mv-3-glucósido, Pt-3-glucósido, Pn-3-glucósido, Cy-3-glucósido, Dp-3-galactósido, Mv-3-galactósido, Pt-3-galactósido, Pn-3-galactósido, Cy-3-galactósido, Dp-3-arabinósido, Mv-3-arabinósido, Pt-3-arabinósido, Pn-3-arabinósido e a Cy-3-arabinósido. Cabrita e Chaves das Neves (2003) identificaram, para além das mencionadas anteriormente, a Dp-3-ramnósido e a Mv-3-ramnósido nos mirtilos *Vaccinium padifolium* e *Vaccinium cillyndraceum*. Barnes, *et al.*, (2009) detetaram várias antocininas aciladas na variedade *Lowbush*, que correspondem a uma combinação entre as cinco agliconas tipicamente encontradas no mirtilo e a (6"-acetil) glucósido e (6"-acetil) galactósido. Nicoueä, *et al.* (2007) encontraram pela primeira vez no mirtilo *Lowbush* antocianinas aciladas com o ácido propiónico, oxálico e succínico, como por exemplo, a Cy-3-(propionil)galactósido, Pn-3-(oxalil)galactósido e a Pn-3-(succinil)arabinósido.

6. Fatores que afetam a estabilidade das antocianinas

Apesar das antocianinas apresentarem uma potencial aplicação como corantes naturais a sua utilização tem sido limitada devido à sua interação com outros compostos presentes na matriz alimentar e baixa estabilidade durante o processamento e armazenamento (Rodriguez-Amaya, 2016).

PH

O pH do meio exerce um papel importante no equilíbrio entre as diferentes formas de antocianinas e, conseqüentemente, na alteração da cor (Figura 6) (Castañeda-Ovando, *et al.*, 2009). As antocianinas apresentam maior estabilidade em soluções ácidas do que em soluções alcalinas (Rein, 2005). Em solução aquosa ácida e neutra existem quatro estruturas de antocianinas em equilíbrio: catião flavílio, base quinoidal, pseudobase carbinol e chacona. A pH inferior a 2, o catião flavílio é a espécie predominante responsável pela coloração vermelha. Um aumento do pH leva a uma perda do próton do catião flavílio dando

origem à base quinoidal que exibe uma cor azul. Simultaneamente ocorre a hidratação do catião flavílio provocando o aparecimento da pseudobase carbinol incolor (Cavalcanti, *et al.*, 2011). Com o contínuo aumento do pH dá-se a abertura do anel da forma carbinol para formar uma estrutura amarela, a chalcona (Rein, 2005).

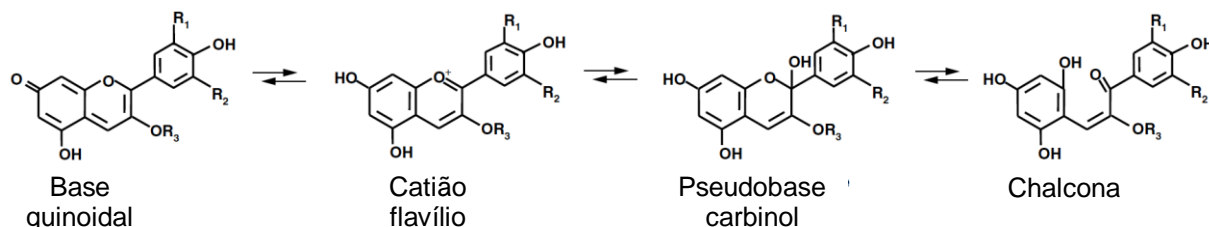


Figura 6 – Estrutura química das várias antocianinas existentes em meio aquoso. Fonte: Rodriguez-Amaya, 2016.

Estudos sobre o efeito da variação do pH na cor em concentrados de morango relatam uma perda de antocianinas de 42% a pH=1 depois de 75 dias de armazenamento e de 80% a pH=5 ao fim de 30 dias (Markakis, 1982). Wang *et al.* (2010), demonstrou que as antocianinas do mirtilo são estáveis a $pH \leq 5$ e que a $pH \geq 7$ há uma degradação significativa das mesmas.

Temperatura

O mecanismo de degradação térmica das antocianinas em sistemas aquosos ainda não é totalmente conhecido. Existem autores que sugerem que a primeira etapa consiste na quebra da ligação glicosídica, seguida da conversão da aglicona a chalcona (Markakis, 1982). Durante o aquecimento, é observado um deslocamento das estruturas de antocianinas em equilíbrio da esquerda para a direita (figura 6), favorecendo a forma chalcona com diminuição das formas catião flavílio e base quinoidal. Um arrefecimento aliado à acidificação provoca uma rápida alteração da base quinoidal e da pseudobase carbinol para a forma catião flavílio. Estas reações são reversíveis e, portanto, as formas incolores das antocianinas podem ser convertidas para a forma catião flavílio (Ribeiro e Seravalli, 2007).

Estudos mostram que o processamento do morango a 100°C durante 1 hora resultou numa perda de 50% das antocianinas, comparando com a composição original do fruto fresco (Markakis, 1982). Wang *et al.* (2010), verificou que temperaturas iguais ou inferiores a 60°C não têm um efeito significativo na estabilidade das antocianinas do mirtilo. Contudo, a

exposição a temperaturas mais elevadas ($\geq 80^{\circ}\text{C}$) durante 2 horas degrada significativamente as antocianinas.

Luz

A luz afeta as antocianinas de dois modos distintos, pois por um lado é essencial para a sua biossíntese e por outro acelera a sua degradação (Markakis, 1982). Estudos realizados demonstram que a cor das antocianinas sofre menos alterações quando estas são armazenadas no escuro (Rein, 2005) e que a presença de luz diminui consideravelmente o conteúdo em antocianinas durante o armazenamento (Cavalcanti, *et al.*, 2011).

Wang *et al.* (2010), constataram que no mirtilo a estabilidade das antocianinas não foi afetada pela ausência de luz e que a presença de luz levou a uma rápida degradação das mesmas, permanecendo apenas 51,3% do total de antocianinas ao fim de 8 dias.

Oxigénio

A natureza insaturada da estrutura das antocianinas torna-as suscetíveis ao oxigénio (Ribeiro e Seravalli, 2007). A presença de oxigénio, juntamente com uma temperatura elevada, constituem os principais fatores responsáveis pela deterioração da cor do morango e do mirtilo (Cavalcanti, *et al.*, 2011). A degradação por ação do oxigénio altera a estrutura química das antocianinas formando compostos incolores ou castanhos (Rein, 2005).

Enzimas

As principais enzimas responsáveis pela degradação enzimática das antocianinas são as glucosidases, peroxidases e as polifenoloxidasas. As glucosidases hidrolisam as antocianinas com libertação do açúcar e da antocianidina. Esta última é instável e degrada-se espontaneamente formando compostos incolores (Markakis, 1982). A polifeniloxidase atua na presença de oxigénio e oxida os compostos fenólicos a quinonas, as quais, por sua vez, reagem com as antocianinas para formar compostos castanhos, alterando assim a cor dos frutos (Ribeiro e Seravalli, 2007). Outros autores citados por Cavalcanti, *et al.*, (2011), verificaram que 29% das antocianinas presentes no mirtilo foram oxidadas pela polifeniloxidase ao fim de 20 minutos de reação. Alguns autores referem que o branqueamento a temperaturas próximas de 50°C durante alguns minutos pode ter um efeito positivo na retenção da cor, uma vez que inativa a atividade enzimática (Patras, *et al.*, 2010).

Co-pigmentação

A co-pigmentação pode ser definida como o fenómeno que resulta da interação entre um pigmento e outro composto (co-pigmento), para formar uma associação molecular ou um complexo com cor (Castañeda-Ovando, *et al.*, 2009), que provoca um aumento da intensidade e da estabilidade da cor das antocianinas (Cavalcanti, *et al.*, 2011). Os co-pigmentos podem ser flavonóides, alcalóides, aminoácidos, ácidos orgânicos, metais ou outras antocianinas. O ácido clorogénico é o principal ácido fenólico livre presente no mirtilo que atua como co-pigmento, encontrando-se também no morango em menores quantidades (Rein, 2005). Apesar da presença de co-pigmentos ser uma vantagem para a estabilidade das antocianinas, estas quando sujeitas a temperaturas elevadas, luz e outros fatores durante um longo período de tempo também começam a degradar-se, embora a sua velocidade de degradação seja menor do que nas antocianinas sem co-pigmentos (Cavalcanti, *et al.*, 2011).

7. Microencapsulação

A microencapsulação é uma tecnologia inovadora que apresenta grande aplicação nas áreas farmacêutica, cosmética e alimentar. É um processo que permite reter uma substância (agente ativo) no interior de outra (agente encapsulante) sob a forma de pequenas partículas. A substância a encapsular apresenta-se geralmente no estado líquido, podendo também ser um sólido ou um gás e é referida como carga, agente ativo, composto ativo, “core” ou núcleo. A substância encapsulante também tem várias designações entre elas, invólucro, membrana, cápsula parede, revestimento ou matriz (Pegg e Shahidi, 2007).

O produto resultante da microencapsulação são as microcápsulas que consistem em pequenas partículas esféricas cujo tamanho pode variar entre os micrómetros e os milímetros (1-1000 μm) e podem apresentar diferentes morfologias dependendo do método e dos materiais utilizados na sua preparação (Fang e Bhandari, 2010). O composto a encapsular pode encontrar-se concentrado na região central da cápsula ou disperso uniformemente numa matriz contendo o agente encapsulante (Azeredo, 2005).

De acordo com Desei e Park (2005) este processo é aplicado no sector alimentar, com várias finalidades, nomeadamente: (1) proteger o material encapsulado das condições ambientais adversas, contribuindo assim para o aumento e manutenção da sua estabilidade, (2) reduzir a taxa de evaporação e de transferência do material para o ambiente, (3) melhorar as propriedades do material encapsulado, mascarando sabores e odores

desagradáveis, (4) modificar as características físicas do material para facilitar o seu manuseamento, (5) libertar de forma controlada o composto ao longo do tempo ou num determinado tempo, (6) separar os componentes presentes numa mistura que podem facilmente reagir entre si.

Na literatura, são vários os autores que estudaram o tema da microencapsulação de antocianinas de modo a melhorar a estabilidade e a biodisponibilidade destes compostos. Entre os métodos mais utilizados para encapsular antocianinas encontra-se o processo de secagem por atomização que representa entre 80-90% das microcápsulas de antocianinas produzidas. No entanto também são utilizadas outros processos, como por exemplo, a liofilização, a emulsificação, a gelificação e o leito fluidizado. A seleção do método de microencapsulação depende de alguns aspectos, tais como, as propriedades físico-químicas da substância a encapsular e do agente encapsulante, a aplicação ou finalidade das microcápsulas, o tamanho e forma das microcápsulas, mecanismo de libertação da substância encapsulada e o custo do método. A microencapsulação aumenta a estabilidade das antocianinas independentemente do método utilizado, porém, o grau de estabilização depende das condições do método de microencapsulação aplicado (Mahdavi, *et al.*, 2014).

As grandes limitações dos métodos de microencapsulação são os custos elevados de todo o processo e a falta de disponibilidade de determinados agentes encapsulantes. (Sanguansri e Augustin, 2010).

7.1. Agente encapsulante

A seleção do agente encapsulante utilizado na microencapsulação é um fator importante, uma vez que influencia a eficiência do processo e a estabilidade das microcápsulas (Mahdavi, *et al.*, 2014). Os critérios usados na escolha do agente encapsulante baseiam-se, sobretudo, nas suas propriedades físico-químicas (solubilidade, massa molecular, cristalinidade, temperatura de transição vítrea ou de fusão, propriedades emulsionantes, entre outros); e do composto a encapsular; na aplicação industrial pretendida e no método de microencapsulação selecionado (Gharsallaoui, 2007).

Segundo Desei e Park (2005) e Pegg e Shahidi (2007) um agente encapsulante ideal deve apresentar as seguintes características:

- Boas propriedades reológicas a elevadas concentrações facilitando deste modo o processo de encapsulamento;

- Capacidade para dispersar ou emulsionar o composto ativo e estabilizar a emulsão produzida;
- Não reagir com o composto a encapsular durante o processamento e o armazenamento;
- Capacidade para selar e manter o composto ativo na sua estrutura durante o processamento e armazenamento;
- Capacidade para libertar completamente o solvente ou outras substâncias utilizadas durante o encapsulamento;
- Capacidade de conferir o máximo de proteção ao encapsulado contra as condições ambientais (oxigénio, temperatura, luz e humidade);
- Ser solúvel em solventes utilizados na indústria alimentar como por exemplo a água e o etanol;
- Ser de qualidade alimentar e económico.

No entanto, nenhum agente encapsulante satisfaz todos os critérios acima mencionados, sendo frequente a mistura de vários encapsulantes ou a adição de antioxidantes e de agentes quelantes e surfactantes para melhorar as propriedades físicas dos mesmos (Desei e Park, 2005). Os materiais escolhidos como encapsulantes devem ainda ser formadores de filmes, flexíveis, inodoros, insípidos e não higroscópicos (Sanguansri e Augustin, 2010).

Existem uma série de agentes encapsulantes, comercialmente aprovados, que são utilizados na microencapsulação de antocianinas, tais como, gomas naturais (goma arábica, alginatos, carragenanos), proteínas (proteínas lácteas, proteínas de soja, gelatina), polissacáridos (maltodextrinas e derivados de celulose) e lípidos (ceras e emulsionantes). Para compostos solúveis em água, como as antocianinas, a substância a encapsular é adicionada ao agente encapsulante e homogeneizada, numa proporção geralmente de 1: 4. No entanto, esta razão pode ser otimizada para cada substância individual a encapsular (Mahdavi, *et al.*, 2014).

Neste trabalho optou-se por usar a inulina como agente encapsulante, dado que a sua utilização na microencapsulação de antocianinas ainda é pouco estudada e pelo facto deste polissacárido oferecer uma combinação única de propriedades funcionais enquanto prébiótico e fibra alimentar.

Inulina

A inulina é uma frutana, também designada por fruto-oligossacárido, obtida principalmente a partir das raízes da chicória. Do ponto de vista estrutural, a inulina é um polímero constituído por várias unidades de frutose que se encontram ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (2,1), podendo ou não ter uma unidade terminal de glucose (Özkan, *et al.*, 2014). O grau de polimerização (GP) e a presença de ramificações influenciam as propriedades funcionais da inulina. A inulina nativa tem um GP que varia entre 10 e 12, enquanto a inulina de cadeia longa apresenta um GP de 25 (Wouters, 2010).

A inulina encontra-se disponível comercialmente na forma de pó branco e inodoro. A inulina nativa é ligeiramente doce (10% de poder adoçante quando comparado com a sacarose), já a inulina de cadeia longa não possui poder adoçante (Franck, 2006). É moderadamente solúvel em água (cerca de 10% à temperatura ambiente), o que permite a sua incorporação em sistemas aquosos sem precipitar e apresenta uma viscosidade relativamente baixa (1,65 mPa a 10°C para uma solução aquosa com 5% de teor de sólidos). A inulina é estável em meios com pH superior a 4, ocorrendo a sua hidrólise a valores de pH mais baixos (Wouters, 2010).

A inulina proporciona vários efeitos benéficos para a saúde humana. As enzimas digestivas humanas não conseguem hidrolisar as ligações β (2,1), possibilitando a passagem da inulina pelo trato gastrointestinal superior sem ser alterada. A inulina chega ao cólon praticamente intacta onde é metabolizada pela microbiota residente em ácidos gordos de cadeia curta, biomassa bacteriana e gases. No cólon a inulina promove o crescimento de bactérias benéficas, principalmente bifidobactérias, exibindo uma atividade prebiótica (Franck, 2006). Assim, a inulina é uma fibra solúvel que promove o bom funcionamento do trato intestinal, através da redução do pH intestinal, alívio da obstipação e aumento do volume das fezes. A ingestão de inulina por via oral não influencia os níveis de glucose no sangue sendo usada como ingrediente na alimentação de pessoas diabéticas. A inulina também melhora a absorção de ferro, magnésio e cálcio permitindo aumentar a densidade mineral óssea e, desta forma, prevenir a osteoporose (Wouters, 2010 e Franck, 2006).

Na indústria alimentar a inulina é utilizada como substituto de açúcar e de gordura, gelificante, espessante, estabilizante de espumas e emulsões conferindo uma sensação suave e macia na boca, agente de textura e, mais recentemente, como agente encapsulante (Wouters, 2010).

7.2. Microencapsulação por atomização

A atomização é o método de microencapsulação mais utilizada na indústria alimentar por ser um processo simples, rápido, eficiente e contínuo originando partículas de elevada qualidade e estabilidade (Pegg e Shahidi, 2007; Kandansamy e Somasundaram, 2012). A secagem por atomização consiste na pulverização de um líquido, formando gotículas que são lançadas numa câmara fechada, que quando entram em contacto com uma corrente de ar aquecido (em fluxo concorrente ou contracorrente), supre o calor necessário à evaporação, havendo, assim a formação de partículas secas – as microcápsulas. O líquido utilizado pode ser uma solução, emulsão ou suspensão (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A microencapsulação por atomização envolve quatro etapas: preparação, homogeneização, atomização e desidratação (Kandansamy e Somasundaram, 2012). Uma vez escolhido o agente encapsulante a utilizar este é hidratado (com ou sem aquecimento) até à concentração de sólidos pretendida. De seguida é adicionado o composto a encapsular e a mistura é homogeneizada (Pegg e Shahidi, 2007). A mistura é bombeada até ao atomizador, onde se transforma num aerossol de finas gotículas. O principal objetivo desta etapa é aumentar a superfície específica, isto é, aumentar a área de contacto entre as partículas e o ar quente, de modo a otimizar as condições de transferência de calor e de massa (Fang e Bhandari, 2012). O tipo de atomizador a utilizar depende da composição e da viscosidade do líquido de alimentação, bem como das características desejadas no produto final (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A etapa seguinte consiste no contacto das partículas com o ar quente. Esta ocorre durante a atomização e dá início ao processo de desidratação. O contacto pode ser efetuado em co-corrente ou em contracorrente. No processo em co-corrente o líquido é pulverizado no mesmo sentido que o fluxo de ar quente. A temperatura do ar de entrada varia entre 150 a 220°C, ocorrendo a evaporação instantânea da água. As partículas obtidas são expostas a uma temperatura de saída que varia entre 50 a 80°C de forma a limitar as degradações térmicas. No processo em contracorrente, o líquido é pulverizado na direção oposta à do fluxo de ar quente, estando o produto seco sujeito a temperaturas elevadas durante mais tempo, o que limita a aplicação deste processo em produtos termo-sensíveis. A principal vantagem é o facto deste processo ser mais económico em termos de consumo de energia (Kandansamy e Somasundaram, 2012).

Durante a etapa de desidratação, o ar quente provoca um aumento da temperatura das partículas de água promovendo a sua evaporação. No momento em que o ar quente entra

em contacto com o líquido atomizado, a secagem sucede-se de forma quase instantânea ocorrendo uma evaporação intensa na superfície de cada partícula (Gharsallaoui *et al.*, 2007). O tempo de exposição das partículas a elevadas temperaturas é curto permitindo manter o núcleo das mesmas a uma baixa temperatura ($<40^{\circ}\text{C}$) (Fang e Bhandari, 2012).

As partículas são recolhidas num ciclone de forma a reduzir as perdas do produto para a atmosfera, as partículas mais densas são recolhidas na base da câmara de secagem e as partículas mais finas passam pelo ciclone para serem separadas do ar húmido (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

De forma a obter uma microencapsulação eficiente devem-se otimizar as condições do método de atomização, sendo os parâmetros mais importantes a temperatura de alimentação, a velocidade de alimentação e a temperatura de entrada e de saída do ar. A temperatura de alimentação influencia a viscosidade do produto líquido, e portanto, a sua capacidade de ser pulverizado de forma homogénea. Quanto mais elevada for esta temperatura menor será a viscosidade e o tamanho das partículas, contudo, pode levar à degradação de compostos termo-sensíveis. A velocidade de alimentação deve ser ajustada de forma a assegurar que todas as partículas atinjam o nível de desidratação pretendido ao entrarem na câmara de secagem (Kandansamy e Somasundaram, 2012). A temperatura do ar de entrada determina a velocidade de secagem e o teor de água final do produto. Quando a temperatura do ar de entrada é baixa, a taxa de evaporação é reduzida o que leva à formação de microcápsulas com membranas de elevada densidade e com elevado teor de água. Por outro lado, uma elevada temperatura do ar de entrada pode causar uma evaporação excessiva resultando na formação de uma membrana quebradiça e, consequentemente, à libertação antecipada e degradação do composto encapsulado. A temperatura do ar de saída não pode ser diretamente controlada, uma vez que depende da temperatura do ar de entrada (Gharsallaoui *et al.*, 2007). As melhores condições de atomização são obtidas através de um compromisso entre uma elevada temperatura do ar de entrada, um elevado teor de sólidos, uma fácil pulverização e uma secagem sem que ocorra a expansão e rutura das microcápsulas (Fang e Bhandari, 2012).

Este método também apresenta algumas desvantagens, tais como, não conseguir condições uniformes na câmara de secagem, dificuldade em controlar o tamanho das microcápsulas (Nedovic, *et al.*, 2011) e haver poucos agentes encapsulantes disponíveis, dado que estes devem ser de grau alimentar e solúveis em água (Desei e Park, 2005).

7.3. Microencapsulação por liofilização

A liofilização é um processo de secagem em que a água é congelada e sublimada passando diretamente do estado vítreo para o estado gasoso, sem passar pelo estado líquido. (Oetjen e Haseley, 2004).

Um liofilizador é constituído por uma câmara de secagem, uma fonte de calor, um condensador e uma bomba de vácuo. O processo é normalmente dividido em três fases: 1) congelação, 2) secagem primária e 3) secagem secundária. Antes da secagem, a solução é congelada a temperaturas inferiores à sua temperatura de congelação eutética (geralmente entre -40°C a -80°C). Na secagem primária a temperatura é ligeiramente aumentada para que ocorra a sublimação dos cristais de gelo a vapor de água sob condições de pressão reduzida (Fang e Bhandari, 2012; Mafart, 1994). Na secagem secundária a pressão usada durante a sublimação mantém-se e há um aumento da temperatura (entre 20 a 60°C) de forma a remover a água residual (Mafart, 1994 e Lorentzen, 1981).

A liofilização é um processo que envolve a transferência de calor e de massa (vapor de água). Na primeira o calor é transferido da fonte de calor para a superfície do produto congelado. Na segunda transferência o vapor de água que é formado durante a sublimação é conduzido até à superfície por um mecanismo de transferência de massa, sendo depois removido através do vácuo. A remoção do vapor de água é importante para que não ocorra um aumento da pressão de vapor e da temperatura na frente de sublimação (fronteira entre a camada seca e a camada congelada) que irá provocar a fusão da água congelada (Lorentzen, 1981).

Na microencapsulação por liofilização o composto a encapsular é dissolvido, disperso ou emulsionado com a substância encapsulante sendo depois sujeito ao processo de liofilização, resultando em microcápsulas com estruturas porosas e indefinidas (Fang e Bhandari, 2010). A qualidade do produto liofilizado é influenciada pelas condições de operação bem como pelas características do produto a liofilizar. A congelação que consiste na primeira etapa da liofilização influencia a estrutura da matriz congelada e as características morfológicas do produto seco. Durante a secagem primária devem ser controladas as condições de pressão e temperatura para evitar o sobreaquecimento e o colapso do produto. Na secagem secundária, é importante que a duração desta fase seja suficiente para permitir que o produto final atinja um teor de humidade estável durante o armazenamento sem no entanto se verificar aquecimento do produto (Fang e Bhandari, 2012).

A microencapsulação por liofilização é um método de desidratação que opera a baixas temperaturas o que torna este método de secagem adequado para compostos sensíveis ao calor. Outras vantagens incluem o facto de ser possível controlar o teor de humidade desejado no produto final, obtendo-se produtos com elevada estabilidade e qualidade (boas características organoléticas e nutricionais). O produto liofilizado é facilmente re-hidratado uma vez que possui uma elevada área superficial específica (estrutura porosa). Contudo, a liofilização é um processo caro e lento, que implica elevados custos de investimento, operação e manutenção (Oetjen e Haseley, 2004).

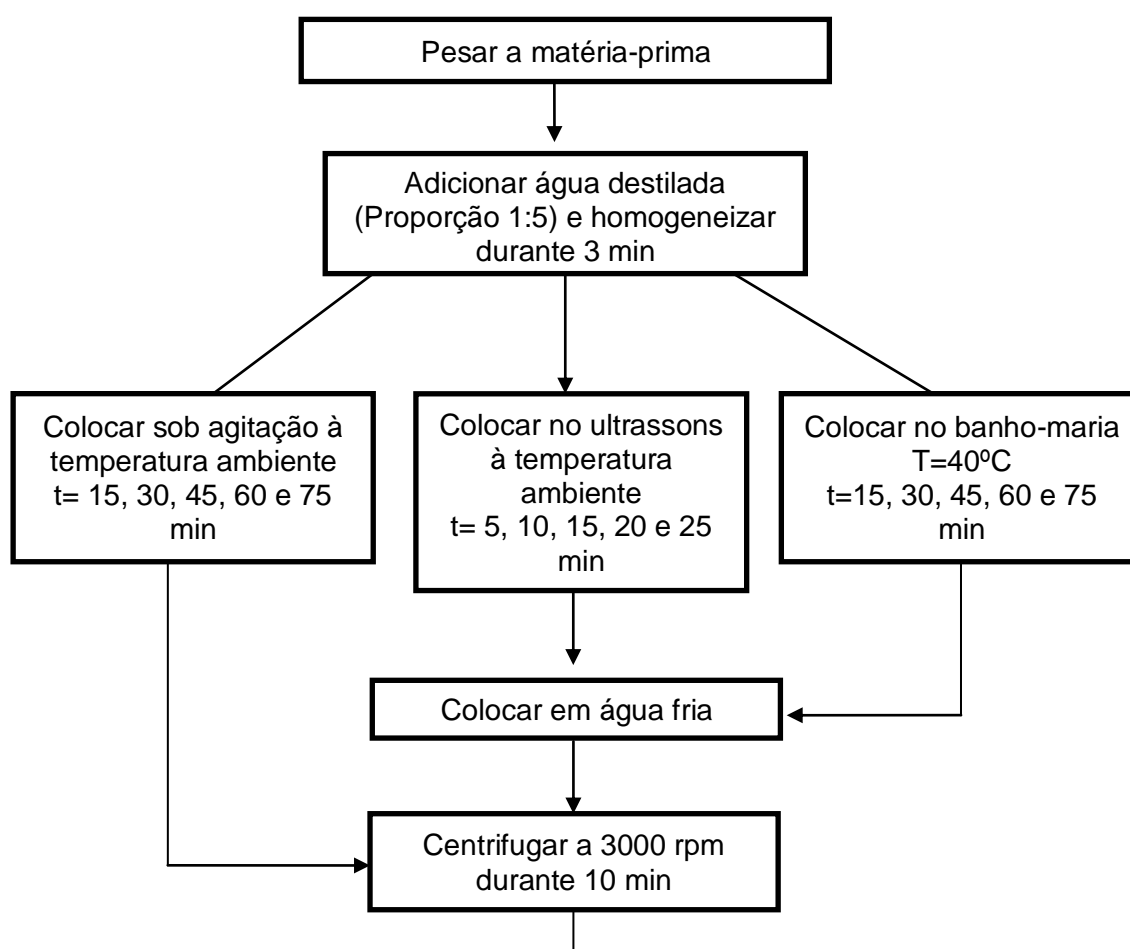
II. Desenvolvimento Experimental

8. Material vegetal utilizado

Os morangos foram adquiridos num supermercado. Os mirtilos foram fornecidos pela empresa Fresh Factor, Portugal. As amostras foram congeladas até serem utilizadas.

9. Processos de extração de antocianinas

Pretendeu-se estudar três processos de extração agitação em placa magnética, em banho de ultrassons e em banho-maria, fazendo variar o tempo de contacto entre a amostra e o solvente (figura 8). A extração de antocianinas foi realizada utilizando água destilada a pH 4,6 e encontra-se esquematizada na figura 7. A eficiência da extração foi medida pela leitura da absorvância a 500 nm que corresponde ao máximo de absorvância das antocianinas. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.



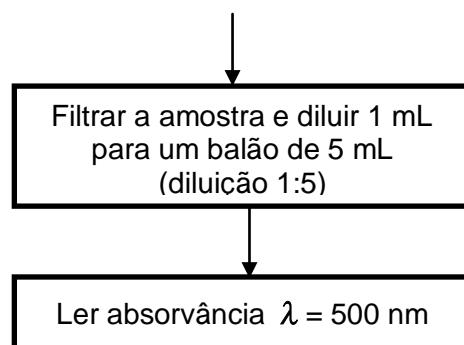


Figura 7 – Processos de extração de antocianinas à temperatura ambiente em placa magnética (t= 13, 30, 45, 60 e 70 min), em banho de ultrassons (t=5, 10, 15, 20, 25 min) e em banho-maria (t=15, 30, 45, 60 e 70 min)

10. Microencapsulação de antocianinas

Com vista a melhorar a estabilidade das antocianinas foram utilizadas dois métodos de microencapsulação: atomização e liofilização.

10.1. Preparação dos extrato de morango e mirtilo para microencapsulação

Morango

Na sequência dos resultados obtidos nas extrações anteriores (secção 10), o delineamento experimental subsequente foi realizado segundo o método de extração à temperatura ambiente (T=20°C) durante 15 minutos na proporção material vegetal: solvente, de 1:5.

A solução de inulina (Alfa Aesar) foi preparada a 30% em água destilada aquecida a temperatura próxima de 80°C. A solução foi agitada até dissolução completa da inulina. Seguidamente deixou-se arrefecer a solução até uma temperatura entre 35 a 45°C. A solução de inulina foi adicionada à solução de extrato na proporção de 1:2. A solução foi homogeneizada em placa magnética durante 1 hora. Parte da solução obtida foi seca por atomização (MA) e outra parte por liofilização (ML). Procedeu-se também à liofilização de solução de extrato sem adição de inulina (L).

Mirtilo

A obtenção dos extratos e a preparação da solução encapsulante foram realizadas do mesmo modo que no caso das amostras de morango. No entanto, no caso do mirtilo, foi apenas realizada a microencapsulação por liofilização.

10.2. Condições de secagem

Para a secagem por atomização o equipamento utilizado foi um Spray-dryer, LabPlant, modelo SD-05. O contacto das partículas com o ar quente ocorreu em co-corrente e as condições de atomização foram as seguintes: velocidade de alimentação de 7 mL/min; temperatura do ar de entrada de 170°C e temperatura do ar de saída de 60°C.

Para a liofilização as amostras foram congeladas a -80°C e colocadas durante 48 horas num liofilizador Telstar LyoQuest.

Os encapsulados foram armazenados em frascos escuros, à temperatura de 25°C até posterior análise.

11. Avaliação da estabilidade

11.1. Termo-estabilidade

Neste estudo, os ensaios de termo-estabilidade foram delineados de acordo com a metodologia das superfícies de resposta (Response Surface Methodology, RSM) para avaliar o efeito de duas variáveis independentes, nomeadamente a temperatura (50°C-100°C, x_1), e o tempo de tratamento (0-120 min, x_2) na cor (C^* , Y_1 ; h° , Y_2 e L , Y_3) e no teor de antocianinas totais (Y_4). Estas variáveis foram escolhidas porque representavam os parâmetros mais relevantes para avaliar a estabilidade dos extratos de morango e mirtilo. Foram realizados um total de 15 ensaios, de acordo com a matriz fatorial composta, com duas variáveis independentes a quatro níveis para cada variável. O ponto central foi repetido sete vezes (tabela 1).

Os extratos de morango e mirtilo preparados conforme descrito na secção 10, foram colocados em tubos hermeticamente fechados, tendo sido depois imersos em água num banho termostaticado. Terminado o tempo de tratamento os tubos foram imediatamente retirados e colocados num banho de gelo. Os extratos foram avaliados quanto ao teor de antocianinas totais e aos parâmetros de cor CieLab (L^* , a^* , b^*). Os extratos, para análise por LC-MS/MS, foram armazenados em frascos escuros, à temperatura de -80°C até posterior análise.

Tabela 1 – Matriz codificada e decodificada para os ensaios de termo-estabilidade

	Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis decodificadas	
		X ₁	X ₂	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Matriz fatorial 2K	1	-1	-1	57	18
	2	-1	+1	57	102
	3	+1	-1	93	18
	4	+1	+1	93	102
Pontos estrela $\alpha = \sqrt{2}$	5	0	- α	75	0
	6	- α	0	50	60
	7	0	+ α	75	120
	8	+ α	0	100	60
Repetições do ponto central	9	0	0	75	60
	10	0	0	75	60
	11	0	0	75	60
	12	0	0	75	60
	13	0	0	75	60
	14	0	0	75	60
	15	0	0	75	60

11.2. Foto-estabilidade

O estudo da foto-estabilidade foi realizado com a solução de extrato e com o extrato microencapsulado produzidos conforme indicado anteriormente (secção 10 e 11.1). As soluções de extrato e microencapsulados por liofilização foram colocados em tubos hermeticamente fechados. Os tubos foram colocados numa câmara climática (Fitoclima 750 E – Aralab) a 25°C, com iluminação constante. A intensidade luminosa (0,014 W.m⁻²) foi medida com um luxímetro com sensor quantum da marca Li-COR modelo LI-250A. As soluções de extrato foram retiradas ao fim de 3, 5, 8, 12, 22 e 29 dias. Os microencapsulados foram retirados ao fim de 5, 12, 22 e 29 dias. Os extratos e os microencapsulados foram avaliados quanto ao teor de antocianinas totais e aos parâmetros de cor CieLab (L*, a*, b*). Os extratos e os microencapsulados, para análise por LC-MS/MS, foram armazenados em frascos escuros, à temperatura de -80°C até posterior análise.

As leituras dos valores da absorvância, a 500 nm, dos extractos de morango e mirtilo, foram usadas para obter os parâmetros que permitem estimar a estabilidade das antocianinas na presença de luz.

Os valores das constantes de velocidade de degradação (K_d) foram determinados pela inclinação da reta representada pelo logaritmo neperiano da absorbância das antocianinas em função do tempo. A partir do K_d determinou-se o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da solução corante, ou seja, o tempo necessário para reduzir em 50% a absorbância inicial das antocianinas, obtido pela equação 1:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (\text{Equação 1})$$

12. Métodos analíticos

12.1. Identificação dos compostos por LC-MS/MS

As análises por LC-MS/MS foram efetuadas num equipamento HPLC *DionexUltimate* 3000 constituído por uma bomba binária HPG3200, um amostrador automático WPS300 com forno de coluna TCC3000 acoplado em linha com um espectrómetro de massa de armadilha de iões LCQ *Fleet*, equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) (*ThermoScientific*).

As separações cromatográficas foram realizadas a temperatura controlada de 35°C, numa coluna de fase-reversa Kinetex C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomex), usando uma fase móvel constituída por água acidulada com 1% (v/v) de ácido fórmico como solvente A e por metanol como solvente B, a um fluxo de 0,3 mL.min⁻¹. Foram injetados 10 µL de amostra através de um injetor Rheodyne com um loop de 25 µL e o programa de gradiente de eluição foi o seguinte: 0-2 min gradiente linear de 0% a 7% B, 2-8 min linear de 7% a 15% de B, 8-25 min linear de 15 a 75% B, 25-27 min linear de 75 a 95 % B; 27-33 min isocrático 95% B e de 33 a 45 min de 95 a 7 % de B. A coluna foi reequilibrada durante 10 minutos.

A ionização ESI foi realizada em modo positivo e os parâmetros instrumentais foram os seguintes: voltagem do spray de ionização, +4,5 kV, voltagem do capilar de transferência 18 V e tensão das lentes de focagem -58 V. O azoto foi utilizado como gás de nebulização e secagem com 80 e 10 unidades arbitrárias, respetivamente, a temperatura do capilar de transferência foi de 270°C. Com o objetivo de caracterizar os vários compostos identificados

nas matrizes foram efetuados ensaios de dissociação induzidas por colisão (ensaios MS²). Estes ensaios foram realizados com uma janela de isolamento de 2 Da, uma energia de colisão variando entre 25 e 35%, e um tempo de ativação de 30 ms. Os espectros correspondem à média de 20-35 digitalizações e foram adquiridos num intervalo de 100-1000 Da. A recolha e tratamento de dados foram realizados recorrendo ao *software* Xcalibur 2.2 SP1.48.

12.2. Métodos espectrofotométricos para avaliar a capacidade antioxidante e o teor de antocianinas totais dos extratos de morango e de mirtilo

A capacidade antioxidante dos extratos aquosos, das amostras liofilizadas e dos microencapsulados foi determinada através dos métodos FRAP e DPPH, o teor de compostos fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu e o teor de antocianinas totais pelo método pH diferencial.

Para preparação das amostras liofilizadas pesaram-se 0,5 g de amostra para um balão de 20 mL, tendo-se preenchido o volume com água destilada. Para as amostras microencapsuladas pesaram-se 1,5 g para 10 mL de etanol a 80% ficando 24 horas a hidratar, de forma desintegrar as microcápsulas para libertar as antocianinas. Após o tempo de hidratação procedeu-se a uma agitação vigorosa com um homogeneizador Ultraturrax T 25 e centrifugou-se a 5 000 rpm durante 10 minutos numa centrífuga Sigma & Laborzentrifugen, 2k15.

12.2.1. Método de Folin Ciocalteu

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado segundo o método Folin Ciocalteu descrito por Slinkard K. e Singleton (1977). Este método baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos presentes na amostra reduzirem a mistura dos ácidos fosfo-volfrâmico e fosfo-molibdénio, em condições básicas, a óxidos de volfrâmio e de molibdénio de cor azul, que apresentam uma absorção máxima a 750 nm.

Num tubo de ensaio, transferiu-se 0,5 mL da amostra previamente diluída, 7,5 mL de água destilada, 0,5 mL de reagente Folin Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e 1,5 mL de carbonato de sódio 20% (Hopkin & Williams). Foi preparado um ensaio em branco, no qual o volume da amostra foi substituído por água destilada. Os tubos foram homogeneizados e colocados no escuro durante 2 horas. Terminado o tempo de reação efetuaram-se as leituras de

absorvância contra o branco num espectrofotômetro Hitachi U-2010 Spectrophotometer. Os ensaios foram realizados em triplicado.

O teor de compostos fenólicos totais é expresso em mg equivalentes de ácido gálico por grama de resíduo seco e foi obtido a partir de uma curva de calibração preparada a partir de diferentes concentrações de ácido gálico (figura 8).

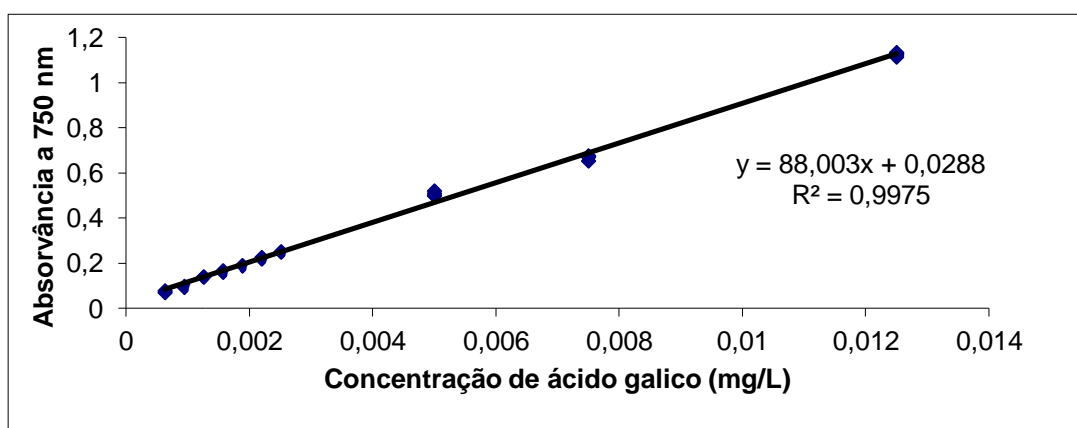


Figura 8 - Curva de calibração para quantificação dos compostos fenólicos totais

12.2.2. Método de redução do ião ferro (FRAP)

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método FRAP foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com modificações apresentadas por Deighton et al (2000). Este método baseia-se na redução, em meio ácido, do complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ) ao complexo Fe^{2+} pelos antioxidantes (redutores) presentes na amostra. O composto formado apresenta uma coloração azul e possui um máximo de absorção a 593 nm.

Primeiramente preparou-se uma solução de reagente FRAP a partir de uma mistura de 3 soluções, previamente preparadas, pela seguinte ordem: 2,5 mL de solução de 10 mmol/L de TPTZ (Sigma-Aldrich) em 40 mmol HCl (Merck), 2,5 mL de solução de 20 mmol/L de cloreto de ferro (III) hexahidratado (Merck) e 25 mL de solução de 16 mL/L de ácido acético (Merck), em de tampão acetado pH=3,6 (Merck). Transferiu-se para um tubo de ensaio 0,2 mL da amostra previamente diluída e 1,8 mL de solução reagente FRAP. Foi preparado um ensaio em branco, no qual se adicionou apenas água destilada ao reagente FRAP. Os tubos foram homogeneizados e colocados no escuro durante 5 minutos. Após esse tempo mediu-

se a absorvância a um comprimento de onda de 593 nm num espectrofotômetro Hitachi U-2010 Spectrophotometer. As determinações foram realizadas em triplicado.

A capacidade antioxidante foi obtida a partir de uma curva de calibração preparada a partir de diferentes concentrações de sulfato de ferroso heptahidratado (figura 9). Os resultados da capacidade antioxidante são expressos em $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ por grama de resíduo seco.

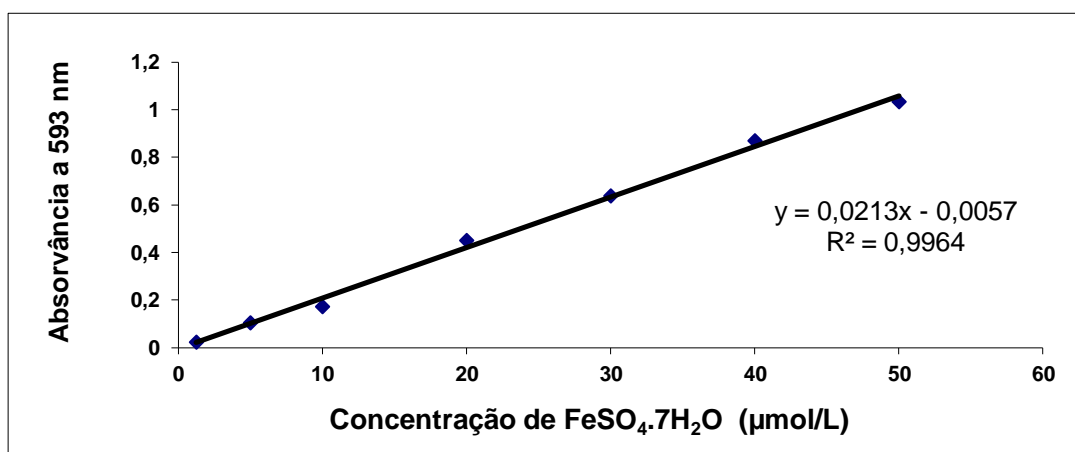


Figura 9 – Curva de calibração para o método FRAP

12.2.3. Método de captação de radicais livres (DPPH)

Para a determinação da capacidade antioxidante foi utilizado o método de captação de radicais descrito por Kondo, *et al.* (2002). Neste método o DPPH (2,2 – Difenil – 1 picrilhidrazilo) é reduzido pelos antioxidantes presentes na amostra, ocorrendo uma diminuição da absorvância a um comprimento de onda de 517 nm que é visível devido à mudança de cor de violeta para amarelo.

Inicialmente preparou-se uma solução *stock*, obtida através da dissolução de 4 mg de reagente DPPH (Sigma-Aldrich) em etanol 95% (v/v) (Carlo Erba) até perfazer 100 mL, resultando neste modo numa solução de DPPH 0,1 mM. A partir do extrato (solução-mãe) efetuaram-se diluições sucessivas: $\frac{1}{2}$ (500 μL para balão de 1 mL), $\frac{1}{5}$ (200 μL para balão de 1 mL), $\frac{1}{10}$ (100 μL para balão de 1 mL), $\frac{1}{20}$ (50 μL para balão de 1 mL), $\frac{1}{40}$ (25 μL para balão de 1 mL) e $\frac{1}{100}$ (10 μL para balão de 1 mL). Todos os balões foram preenchidos com água destilada. Seguidamente, a cada um dos tubos de ensaio, previamente identificados, foram colocados 100 μL da solução-mãe e respectivas soluções diluídas e 2 mL de DPPH 0,1 mM. Foram preparados dois ensaios em branco, o branco etanol foi preparado com 200 μL de água destilada e 4 mL de etanol a 95%, para o branco

DPPH utilizou-se 200 µL de água destilada e 4 mL de DPPH 0,1 mM. Todos os tubos foram homogeneizados e colocados no escuro durante 1 hora. Após o tempo de reação, efetuaram-se as leituras de absorvância a 517 nm no espectrofotômetro Hitachi U-2010 Spectrophotometer. Os ensaios foram realizados em triplicado.

A captação de radicais é expressa em valor EC₅₀ (mg/mL), que é definido por Roesler, *et al.* (2007) como a concentração de extrato necessária para inibir a oxidação do radical em 50% e também através do Índice de Atividade Antioxidante (IAA) a partir das equações 2 e 3, respetivamente.

Cálculo do parâmetro EC₅₀

$$\text{Inibição de DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs branco DPPH} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs branco DPPH}} \times 100$$

(Equação 2)

$$\text{EC}_{50} \rightarrow y = 50$$

Cálculo do Índice de Atividade Antioxidante (IAA)

$$\text{IAA} = \frac{\text{Concentração final de DPPH}}{\text{EC}_{50}}$$

(Equação 3)

12.2.4. Método do pH diferencial

A quantificação das antocianinas totais foi efetuada de acordo com o método do pH diferencial descrito por Wroslstad (1976). Este método baseia-se nas alterações estruturais reversíveis que ocorrem nas antocianinas que exibem colorações diferentes quando são sujeitas a variações de pH. Assim, a pH 1 as antocianinas apresentam-se na forma flavílio exibindo uma coloração intensa, enquanto a pH 4,5 as antocianinas praticamente não apresentam coloração, predominando a forma carbinol. A diferença de absorvância medida espectrofotometricamente é proporcional ao total de antocianinas.

Para o método de pH diferencial foram utilizadas soluções tampão pH 1,0 e 4,5. A solução tampão pH 1,0 foi preparada a partir de uma mistura de 125 mL de cloreto de potássio 0,2 M (Merck) e de 385 mL de ácido clorídrico 0,2 N. A solução tampão pH 4,5 foi preparada a partir de uma mistura de 400 mL de acetato de sódio tri-hidratado 1 M (Merck), 240 mL de

ácido clorídrico 1N e de 360 mL de água destilada. Seguidamente, transferiu-se 1 mL de extrato para dois balões volumétricos de 10 mL para o caso dos extratos aquosos, e para dois balões de 5 mL para as amostras liofilizadas e microencapsuladas tendo-se preenchido o volume com as soluções tampão pH 1,0 e 4,5, respetivamente. Após 5 minutos no escuro, foram medidos os valores de absorvância a 510 nm e a 700 nm num espectrofotómetro Hitachi U-2010 Spectrophotometer, utilizando-se água destilada como branco. A leitura a 700 nm foi feita com o objetivo de eliminar possíveis interferências de alguns materiais uma vez que a este comprimento de onda as antocianinas não absorvem. As determinações foram realizadas em duplicado.

O teor de antocianinas totais foi calculado através da equação 4, sendo o resultado expresso em mg de equivalentes de pelargonina-3-glucósido por grama de resíduo seco, para o caso do morango. Para os mirtilos os resultados são expressos em mg de equivalentes de malvidina-3-glucósido por grama de resíduo seco.

Cálculo das Antocianinas Totais

$$\text{Antocianinas (mg/L)} = \frac{A \times MM \times DF \times 10^3}{\epsilon \times L}$$

(Equação 4)

Onde:

- A é a absorvância total calculada por:

$$A = (\text{Abs}_{510} \text{ pH1} - \text{Abs}_{700} \text{ pH1}) - (\text{Abs}_{510} \text{ pH4,5} - \text{Abs}_{700} \text{ pH4,5})$$

- MM é a massa molar da pelargonina-3-glucósido (433,2 g.mol⁻¹) e da malvidina-3-glucósido (493,5 g.mol⁻¹);
- FD é o fator de diluição;
- ϵ o coeficiente de absorvidade molar da pelargonina-3-glucósido (22 400 L.mol⁻¹.cm⁻¹) e da malvidina-3-glucósido (28 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹);
- L é o comprimento da célula (1 cm).

12.3. Parâmetros da cor

A cor dos extratos aquosos e dos microencapsulados foi determinada utilizando dois colorímetros Minolta Chroma Meter CT-310 e CR-310, respetivamente, com um iluminador D65 e ângulo de observação de 2° . Os resultados obtidos foram apresentados no espaço uniforme de cor CIE (L, a*, b*). Os parâmetros L*, a* e b* foram convertidos para R, G, B

através do programa EasyRBG. Os atributos C^* e h^0 foram calculados a partir das fórmulas: $C^* = [(a^2 + b^2)^{1/2}]$ e $h^0 = [\tan^{-1} (b/a)]$. Todas as leituras foram realizadas em triplicado.

12.4. Análise morfológica das microcápsulas

A morfologia dos microencapsulados foi observada por SEM. As amostras foram fixadas num pino de metal com fita adesiva e revestidas com uma mistura de ouro (95%) e de paládio (5%) pelo método de deposição de plasma num dispositivo de revestimento Polaron E5350 e observadas num microscópio de varrimento Jeol JSM-5410. As imagens foram obtidas com um potencial de aceleração de 10 kV.

12.5. Métodos estatísticos

Os resultados foram submetidos a análise de variância a um fator (Anova) através do teste de Tukey para um nível de significância de 95%. Os resultados dos ensaios de termo-estabilidade foram analisados pelo Método de Superfícies de Resposta (RSM). O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado com recurso ao software, Statistica™ v8.0 (Statsoft, Inc., 2007).

De acordo com Montgomery (1997), a metodologia das superfícies de resposta (Response Surface Methodology, RSM) consiste num conjunto de métodos matemáticos e estatísticos que são usados para modelar e analisar problemas nos quais a resposta de interesse é influenciada por várias variáveis. Este método permite explorar diversas condições operatórias de um sistema com redução do número de experiências fornecendo resultados estatisticamente aceitáveis, o que se traduz em economia de tempo e dinheiro.

Os ensaios de delineamento experimental foram realizados de acordo com a matriz fatorial composta que é formada por três conjuntos de pontos experimentais (figura 10): (i) uma matriz fatorial 2^k (k é o número de variáveis) que representa os pontos extremos superior e inferior (-1,1), correspondentes ao vértice de um cubo cujo centro é a origem (0,0), (ii) um conjunto de pontos estrela, representados por α e $-\alpha$. Estes pontos são exteriores à matriz fatorial, mas encontram-se dentro do domínio experimental e situam-se a uma distância $\alpha = \sqrt{2}$ do ponto central, para o caso de duas variáveis e (iii) um conjunto de repetições do ponto central (0,0) situado na origem dos eixos, para estimar a variância do erro experimental que se considera constante ao longo de todo o domínio experimental (Montgomery, 1997).

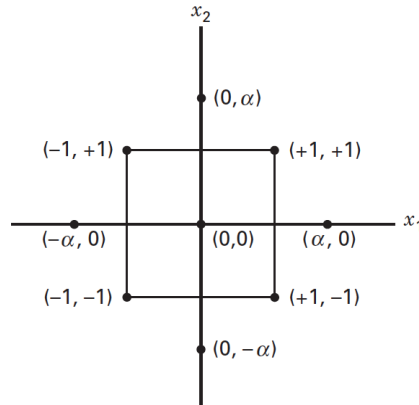


Figura 10 – Central Composite Rotatable Design para dois fatores X_1 e X_2

Os resultados experimentais foram ajustados às equações polinomiais (equação 4) que traduzem a variável dependente Y em função das variáveis X_i , dando origem a uma superfície de resposta com $k+1$ dimensões.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (\text{Equação 4})$$

Em que:

Y – variável dependente;

x_1, x_2 – variáveis independentes;

β_1, β_2 – coeficientes lineares;

β_{11}, β_{22} – coeficientes quadráticos;

β_{12} - coeficiente linear de interação X_1 e X_2 .

A qualidade do ajustamento do modelo foi avaliada pelos coeficientes de determinação (R^2) e o ajustado ($R^2_{\text{ajust.}}$). O R^2 e o $R^2_{\text{ajust.}}$ variam entre 0 e 1, sendo este último sempre inferior a R^2 , e quanto mais próximos estiverem de 1, mais o modelo se ajusta à realidade. Considerou-se um nível de ajuste adequado para os modelos quando R^2 é superior a 0,7 e quando a diferença entre R^2 e $R^2_{\text{ajust.}}$ é menor que 0,1.

III. Resultados e Discussão

13. Estudo do processo de extração de antocianinas

Um dos objetivos deste trabalho foi estudar o processo de extração de antocianinas a partir da matriz de morango. Como estes compostos são hidrossolúveis utilizou-se água a pH=4,6 como solvente por ser admissível na indústria alimentar, não tóxico e ambientalmente mais aceitável em relação aos solventes orgânicos. Foram realizados 3 processos de extração: sob agitação em placa magnética à temperatura ambiente, ultrassons e banho-maria (T=40°C) fazendo variar o tempo (5 a 75 min) de modo a maximizar a extração de antocianinas (Anexo II). Na figura 11 encontram-se os resultados obtidos para cada uma das metodologias utilizadas.

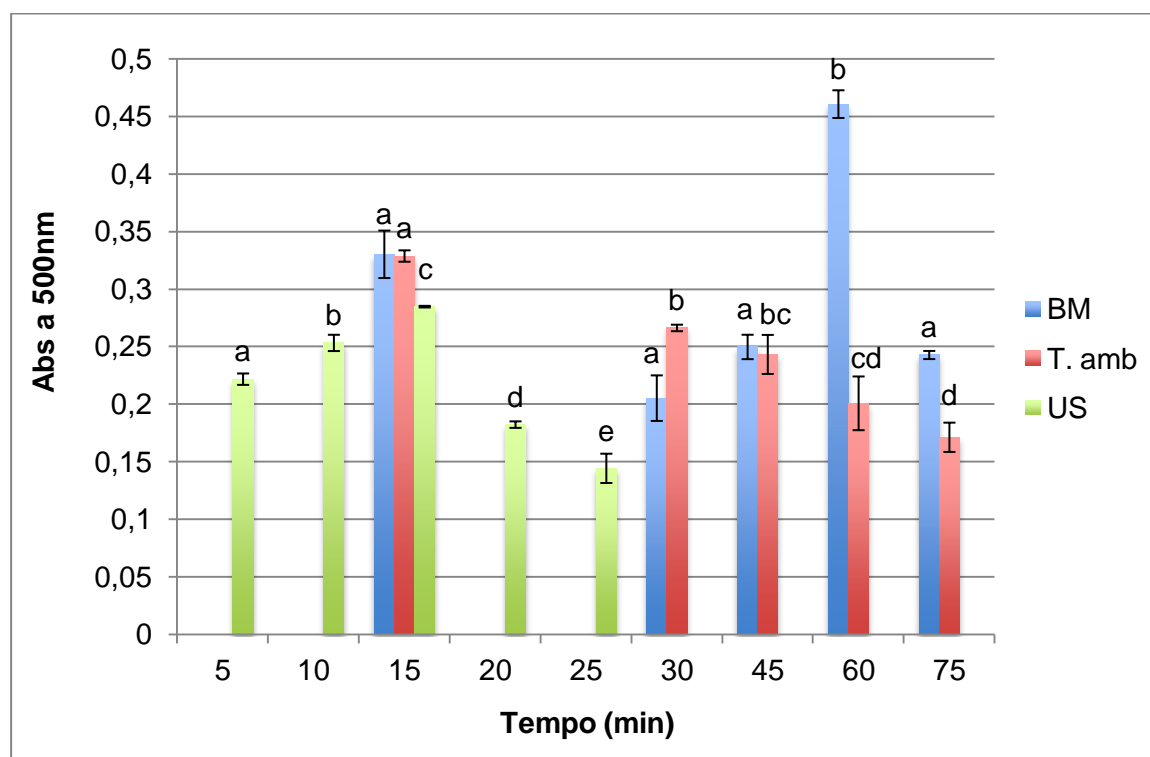


Figura 11 – Valores absorvância a 500nm para o extrato de morango em função do tempo para o processo de extração em banho de ultrassons (US), em banho-maria (BM) e em placa de agitação à temperatura ambiente (T.amb). Valores médios \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro do mesmo processo.

Os valores de absorvância a 500 nm obtidos para o método de extração de ultrassons variam entre 0,14 e 0,28. Na figura 11 observa-se um aumento gradual da extração de antocianinas com o aumento do tempo de extração até aos 15 minutos, tendo apresentado um valor significativamente superior em relação aos restantes tempos de extração. Para

tempos de extração superiores a 15 minutos observa-se uma diminuição da extração de antocianinas, atingindo um mínimo aos 25 minutos. Os diferentes tempos de extração das antocianinas totais apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

Para o processo de extração em banho-maria obtiveram-se valores de absorvância entre 0,21 e 0,46. O tempo de 60 minutos apresentou uma extração de antocianinas significativamente superior ($p < 0,05$) aos outros tempos de extração, não tendo-se registado diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tempos de 15, 30, 45 e 75 minutos.

O processo de extração das antocianinas à temperatura ambiente sob agitação em placa magnética apresentou valores de absorvância que variam entre 0,33 e 0,17 mg.L^{-1} . Verifica-se uma diminuição da extração de antocianinas com o aumento tempo de extração, tendo-se registado aos 15 minutos um valor significativamente superior ($p < 0,05$) aos restantes tempos de extração. O tempo de extração de 45 minutos não apresentou diferenças significativas no valor de absorvância ($p > 0,05$) para os tempos de 30 e 60 minutos, não tendo o tempo de 60 minutos apresentado, igualmente, diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação aos 75 minutos.

Um estudo realizado por Wang, *et al.* (2016) mostrou que o processo de ultrassons promove uma maior extração de antocianinas quando comparado com o método de extração às temperaturas de 30, 50, 60 e 70°C. Estes resultados não estão concordantes com os obtidos neste estudo, onde os processos de extração de banho-maria e de agitação à temperatura ambiente apresentaram maior teor de antocianinas totais quando comparado com o processo de ultrassons.

Oancea, *et al.* (2012) mostraram que um aumento da temperatura proporciona uma maior extração de antocianinas, resultados que estão de acordo aos obtidos neste estudo onde se observa uma maior da extração no processo em que se utiliza uma temperatura mais elevada, o processo em banho-maria. De acordo com Tan *et al.* (2013) um aumento da temperatura de extração aumenta a permeabilidade dos tecidos celulares, facilitando a migração das antocianinas para o solvente. No entanto, tempos de extração longos podem resultar numa degradação e oxidação das antocianinas, devido à longa exposição destes compostos a fatores ambientais desfavoráveis como a temperatura, luz e oxigénio.

Neste estudo optou-se por realizar a extração das antocianinas totais à temperatura ambiente com um tempo de 15 minutos. Esta escolha teve por base o menor consumo de energia e menos custo possibilitando igualmente uma boa extração de antocianinas.

14. Avaliação da estabilidade

14.1. Termo-estabilidade

No anexo III encontra-se os resultados do teor de antocianinas totais e dos parâmetros de cor dos extratos de morango e de mirtilo, quando expostos à temperatura e ao tempo de tratamento.

Para o extrato de morango verifica-se que a temperatura linear e quadrática, o tempo linear e a interação (T, t) foram significativas para o teor de antocianinas totais ($p < 0,05$). Para o extrato de mirtilo os efeitos significativos foram idênticos, tendo ainda o tempo quadrático apresentado efeitos significativos no teor de antocianinas totais. Na saturação da cor (C^*) os efeitos significativos ($p < 0,05$), para o extrato de morango, foram a temperatura e o tempo linear e quadrático e a interação das duas variáveis. Para o extrato de mirtilo os efeitos significativos ($p < 0,05$) foram os mesmos, com exceção do tempo quadrático. Na tonalidade de cor (h^0) os únicos efeitos significativos ($p < 0,05$), para o extrato de morango, foram a temperatura e o tempo linear. Para o extrato de mirtilo os efeitos significativos ($p < 0,05$), foram os efeitos linear e quadrático da temperatura e do tempo. Para a luminosidade (L) do extrato de morango nenhuma das variáveis temperatura e tempo assim como a sua interação apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$). Para o extrato de mirtilo os efeitos significativos ($p < 0,05$) para a luminosidade, foram a temperatura linear e quadrática, o tempo linear e a interação de ambas as variáveis.

Na tabela 2 encontram-se os modelos que expressam o teor de antocianinas totais, a saturação (C^*), a tonalidade (h^0) e a luminosidade (L) da cor dos extratos de morango e de mirtilo. Os modelos foram definidos em função das variáveis temperatura e tempo com efeitos significativos nas variáveis dependentes estudadas, de modo que não foi possível apresentar um modelo que descrevesse as variações de luminosidade para o morango. Os modelos obtidos apresentam ajustes adequados, uma vez que os coeficientes de regressão (r^2) situam-se próximos da unidade e do r^2 ajustado ($< 0,1$), revelando um carácter preditivo e uma boa reprodutibilidade dos erros experimentais, dentro da gama de variação estudada. A temperatura revelou ser a variável com efeito mais marcante na estabilidade das antocianinas e da cor exercendo efeitos linear e quadrático para a maioria das variáveis dependentes estudadas, tendo o tempo apresentado um efeito menos expressivo.

Tabela 2 – Equações dos modelos ajustados aos valores experimentais para o teor de antocianinas totais e parâmetros da cor (C^* , h^0 , L) de morango e mirtilo em função da temperatura e tempo de tratamento

		Equação polinomial do modelo	r^2	r^2_{ajust}
Morango	Teor de antocianinas totais	$27,30 - 8,28T - 3,81T^2 - 4,35t - 3,59Tt$	0,93	0,89
	C^*	$58,89 - 9,19T - 3,03T^2 - 4,14t + 1,67t^2 - 4,30Tt$	0,97	0,95
	h^0	$57,62 - 1,87T - 2,03t$	0,81	0,70
Mirtilo	Teor de antocianinas totais	$37,41 - 21,54T - 7,14T^2 - 9,72t + 5,83t^2 - 7,44Tt$	0,99	0,99
	C^*	$65,96 - 9,85T - 6,69T^2 - 4,60t - 5,57Tt$	0,93	0,87
	h^0	$41,64 - 5,51T - 1,32T^2 - 2,52t + 1,63t^2$	0,97	0,96
	L	$35,46 + 8,22T + 4,39T^2 + 1,45t + 2,22Tt$	0,97	0,95

As figuras 12, 13, 14 e 15 mostram os gráficos de superfície de resposta para o teor de antocianinas e para os parâmetros C^* , h^0 e L da cor dos extratos de morango e de mirtilo, respetivamente (Anexo III).

A concentração de antocianinas diminui à medida que a temperatura e o tempo de tratamento aumentam, para ambos os extratos, sendo que temperaturas e tempos mais elevados conduzem a maior degradação. Wang *et al.* (2010) também verificaram que o aumento da temperatura leva a um aumento da degradação de antocianinas. Relativamente à cor observa-se uma diminuição do parâmetro C^* , com o aumento da temperatura e do tempo, nos dois extratos, resultando numa cor menos intensa. Quanto ao parâmetro h^0 , este é mais influenciado pela temperatura e pelo tempo de tratamento no caso do extrato de mirtilo do que no extrato de morango, ocorrendo uma diminuição à medida que estas duas variáveis independentes aumentam. Quanto à luminosidade do extrato de morango, o modelo não ajustou e por isso não foi possível apresentar uma figura que representa-se as variações desta variável. No entanto, para o extrato de mirtilo observa-se um aumento do parâmetro L com o aumento da temperatura e do tempo, o que evidencia uma descoloração da cor. Na tabela 3 encontra-se representado a variação da cor dos extratos de morango e de mirtilo submetidos a diferentes condições de temperatura e tempo durante o ensaio de termo-estabilidade.

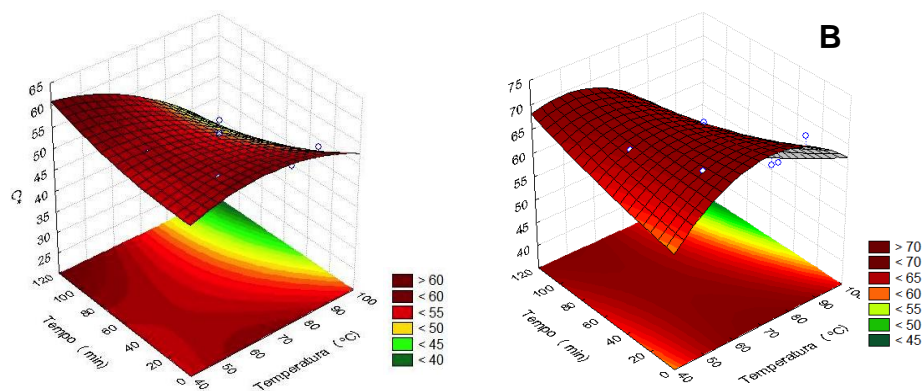


Figura 12 – Superfície de resposta para o teor de antocianinas totais em função da temperatura e tempo de tratamento: (A) morango e (B) mirtilo

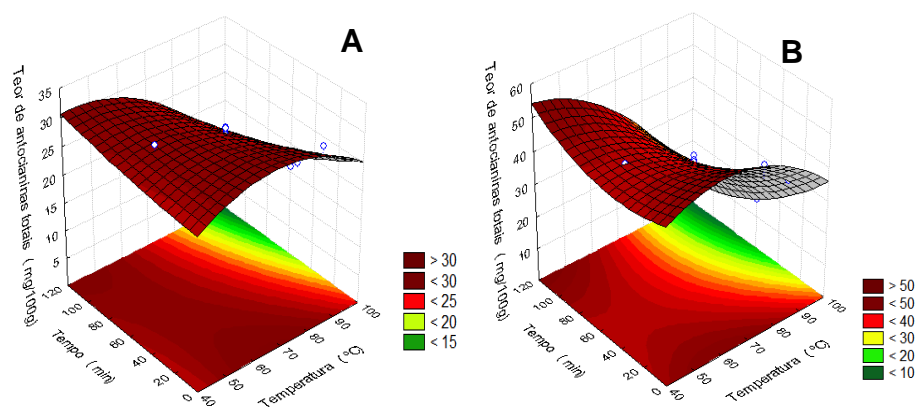


Figura 13 – Superfície de resposta para o parâmetro C* em função da temperatura e tempo de tratamento: (A) morango e (B) mirtilo

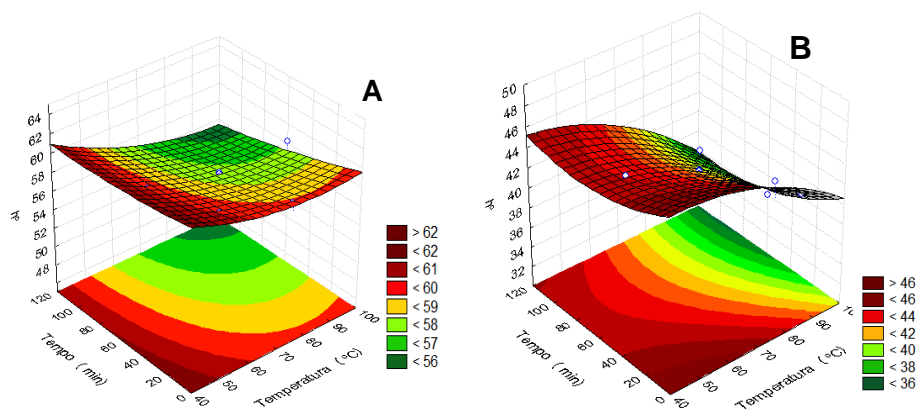


Figura 14 – Superfície de resposta para o parâmetro h^0 em função da temperatura e tempo de tratamento: (A) morango e (B) mirtilo

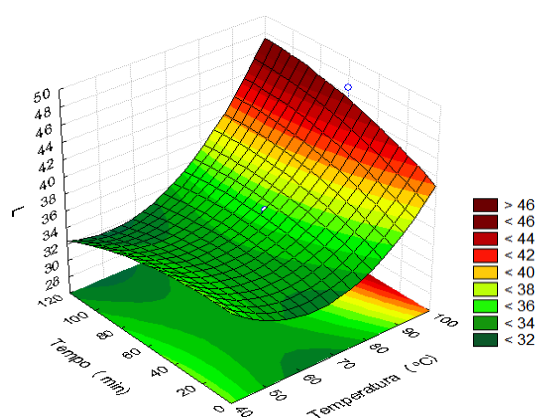


Figura 15 – Superfície de resposta para o parâmetro L em função da temperatura e tempo de tratamento para o extrato aquoso de mirtilo

Tabela 3 – Variação da cor resultante dos extratos de morango e de mirtilo em função da temperatura (°C) e do tempo de tratamento (min)

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Morango	Mirtilo
75	0		
50	60		
57	18		
57	102		
75	60		
75	60		
75	60		
75	60		
75	60		
75	60		
75	60		
75	120		
93	18		
93	102		
100	60		

14.2. Foto-estabilidade

As figuras 16, 17, 18 e 19 representam a variação do teor de antocianinas e dos parâmetros da cor (L, C* e h°) ao longo do tempo de exposição à luz, para os extratos de morango e de mirtilo (Anexo IV).

Os resultados obtidos mostram que a presença de luz conduz a uma degradação significativa do teor de antocianinas, em ambos os extratos. Para o extrato de mirtilo verifica-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) do teor de antocianinas nos primeiros 3 dias de exposição à luz (de 3,39 para 0,41 mg.g⁻¹), tendo-se mantido constante até ao dia 29. Para o extrato de morango, observa-se uma variação mais gradual ao longo do tempo de exposição, tendo-se registado uma diminuição significativa do teor de antocianinas ($p < 0,05$) até ao dia 22 (de 5,01 para 2,05 mg.g⁻¹). Ao fim de 29 dias na presença de luz registou-se uma perda de 59% e 88% do total de antocianinas nos extratos de morango e de mirtilo, respetivamente. Estes resultados estão de acordo com Wang *et al.* (2010) que também verificaram que o efeito da luz implica uma diminuição significativa do teor de antocianinas.

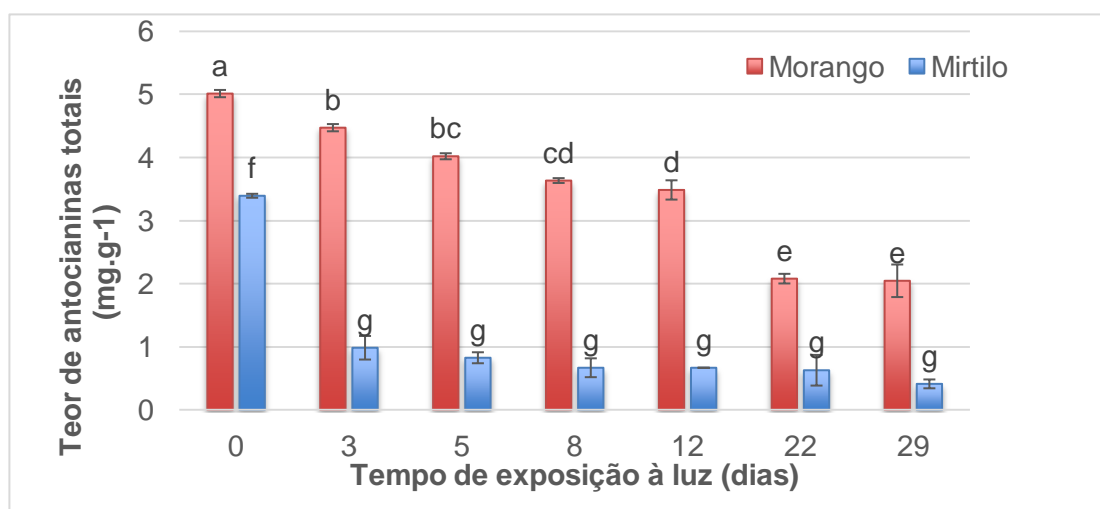


Figura 16 – Variação do teor de antocianinas totais em função do tempo de exposição à luz. Valores médios \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Relativamente à cor dos extratos, verifica-se que esta é igualmente influenciada pela presença de luz. Ao longo do tempo de exposição observa-se um aumento do parâmetro L, para ambos os extratos, resultando numa descoloração da cor. Quanto ao parâmetro C* observa-se uma diminuição ao longo do tempo, para os dois extratos, originando uma cor menos intensa. Em relação ao parâmetro h° também se observa uma ligeira diminuição ao longo do tempo, tanto para o extrato de morango como para o de mirtilo resultando numa modificação da cor original. Ao fim de 29 dias na presença de luz a 25°C (tabela 4) a cor do

morango mudou de uma cor alaranjada para laranja pálido e a do mirtilo de uma cor vermelha para rosa escuro. Estas alterações nos parâmetros da cor ocorreram devido à degradação das antocianinas.

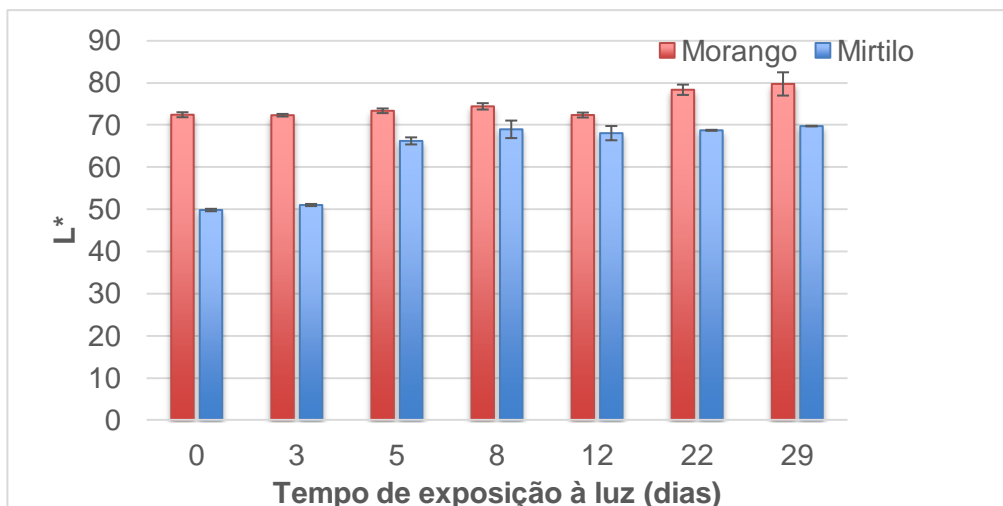


Figura 17 – Variação do parâmetro de cor L^* dos extratos de morango e de mirtilo em função do tempo de exposição à luz. Valores médios \pm desvio-padrão

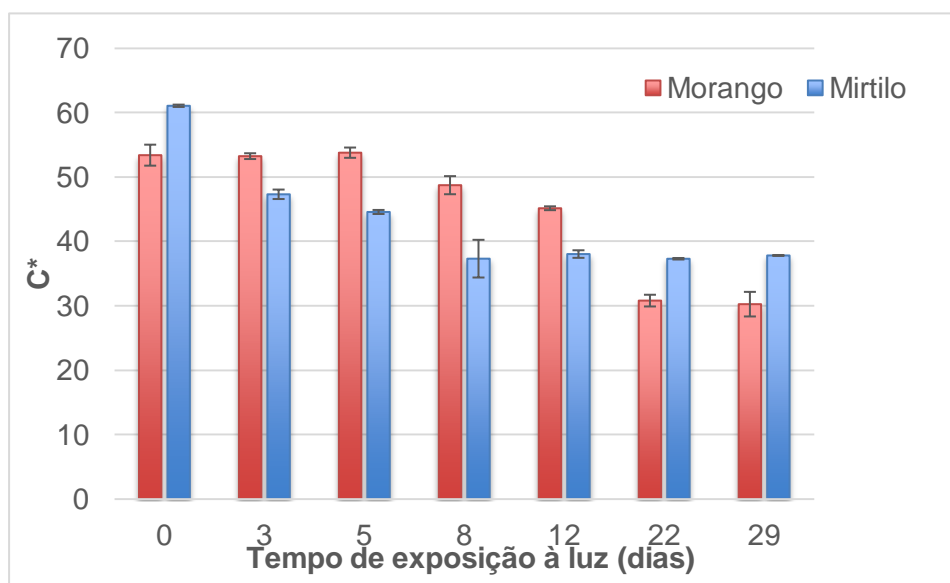


Figura 18 – Variação do parâmetro de cor C^* dos extratos de morango e de mirtilo em função do tempo de exposição à luz. Valores médios \pm desvio-padrão

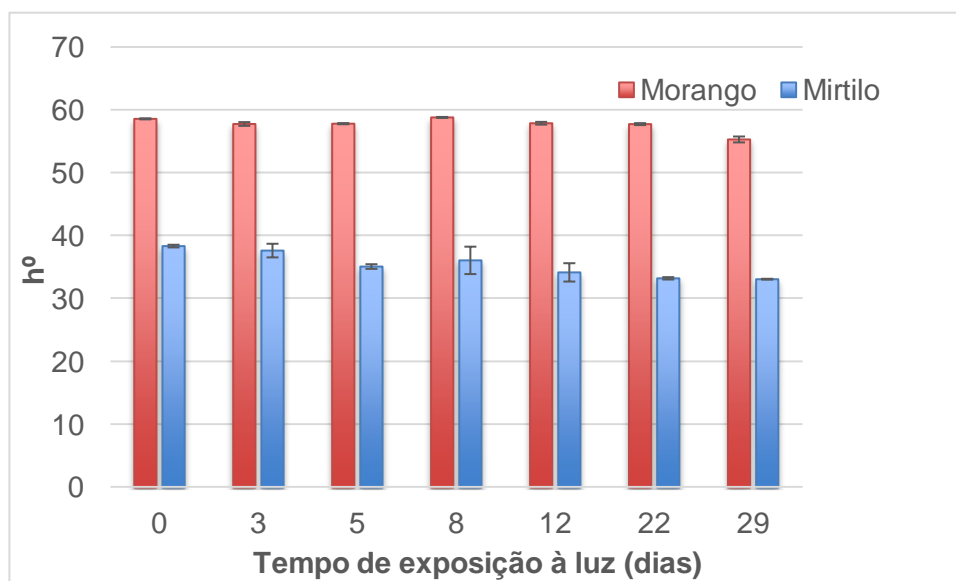
















Figura 19 – Variação do parâmetro de cor h° dos extratos de morango e de mirtilo ao longo do tempo de exposição à luz. Valores médios \pm desvio-padrão

Tabela 4 – Cor resultante dos extratos de morango e de mirtilo em função do tempo de exposição à luz

Dias	Morango	Mirtilo
0		
3		
5		
8		
12		
22		
29		

Quanto aos microencapsulados de morango liofilizados (figura 20), não foram observadas alterações nos parâmetros da cor (L , C^* , h°) ao longo do tempo de exposição à luz. Estes resultados mostram que a microencapsulação confere uma boa proteção e estabilidade à luz permitindo preservar a cor original dos microencapsulados (tabela 5). Jiménez-Aguilar, *et al.* (2011), também verificaram uma boa estabilidade da cor à luz em microencapsulados de mirtilo por atomização. Não foi possível avaliar a estabilidade à luz dos microencapsulados

de morango atomizados e de mirtilo liofilizados e atomizados devido a insuficiente quantidade de amostra para realizar os ensaios.

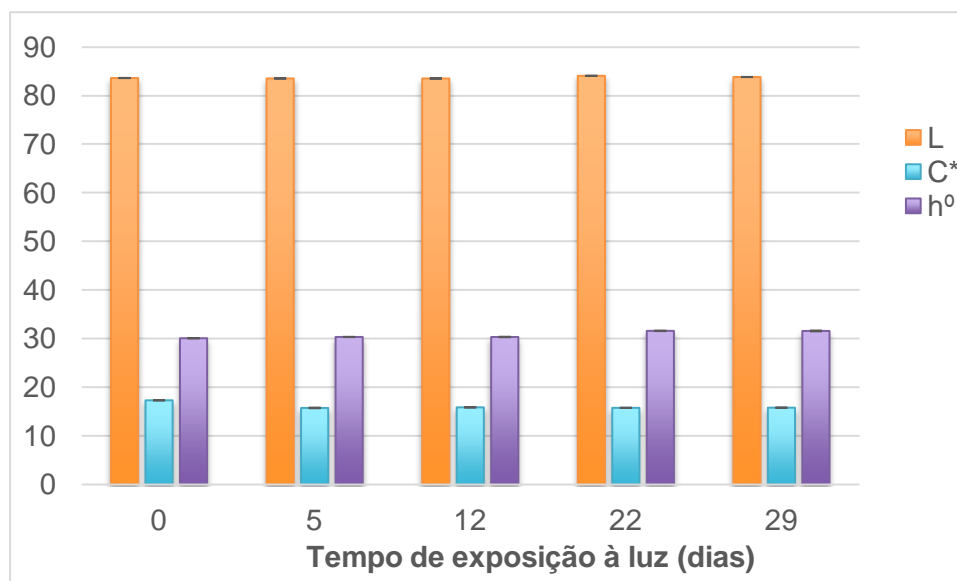


Figura 20 – Variação dos parâmetros de cor L*, C* e h° dos microencapsulados de morango liofilizados em função do tempo de exposição à luz. Valores médios \pm desvio-padrão

Tabela 5 – Cor resultante dos microencapsulados de morango liofilizados em função do tempo de exposição à luz

Dias	Microencapsulado de morango liofilizado
0	
5	
12	
22	
29	

Determinação das constantes de degradação e dos tempos de meia vida para os extratos de morango e de mirtilo expostos à luz

Os gráficos obtidos a partir dos valores de absorvância dos extratos de morango e de mirtilo que representam a degradação das antocianinas expostas à luz, bem como as respectivas equações e valores de K_d e $t_{1/2}$ encontram-se na figura 21 e na tabela 6, respectivamente.

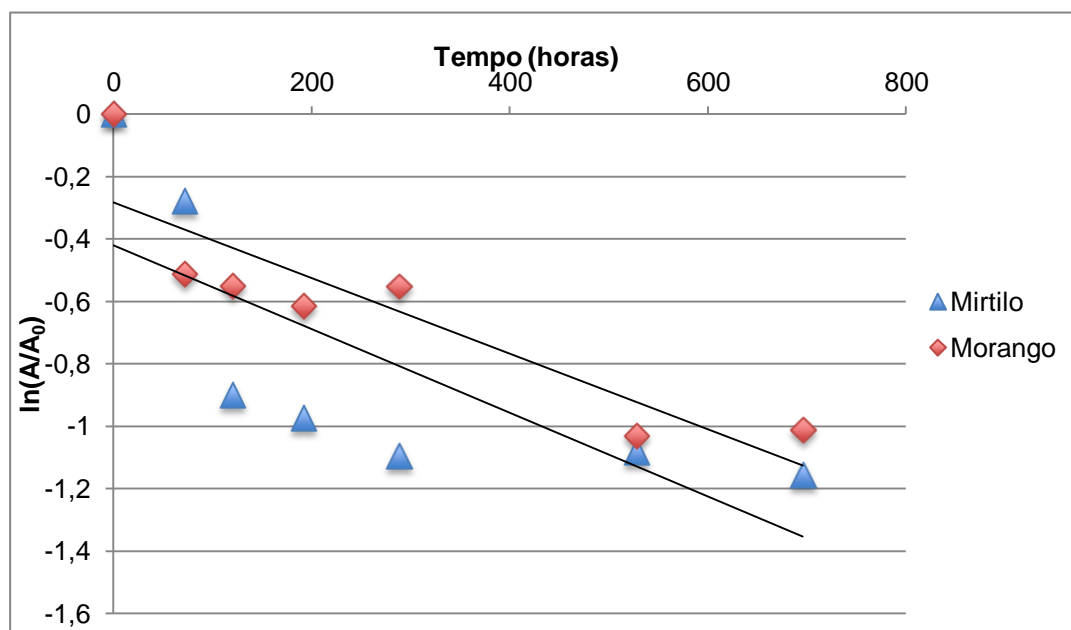


Figura 21 – Valor de absorvância a 500 nm das antocianinas, presentes nos extratos de morango e de mirtilo, em função do tempo de exposição à luz.

Pelos valores da constante de degradação (K_d) e pelos tempos de meia vida ($t_{1/2}$), visualizados na Tabela 6, percebe-se a influência da luz sobre as soluções corantes ao longo do tempo, ou seja, quanto maior o tempo de exposição à luz, maior a constante de degradação e, conseqüentemente, menor o tempo de meia-vida das antocianinas.

Os valores de K_d confirmam uma maior degradação do corante obtido a partir do mirtilo na presença de luz em relação ao de morango, sendo estimado um tempo de meia-vida de 22 dias para os extratos de mirtilo e de 24 dias para os extratos de morango expostos à luz. Os resultados obtidos também mostram que em cerca de 1 mês ocorreu uma rápida degradação das antocianinas.

Tabela 6 – Equações de regressão, coeficiente de regressão (r^2) e valores da constante de velocidade de degradação (K_d) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) ao longo do tempo de exposição à luz dos extratos de morango e de mirtilo

Extrato	Equação da reta	K_d	$t_{1/2}$ (dias)
Morango	$\ln y = -0,0012 t - 0,2832$ $r^2=0,78$	0,029	24
Mirtilo	$\ln y = -0,0013 t - 0,4208$ $r^2=0,56$	0,0322	22

Para os extratos de morango e de mirtilo do ensaio de termo-estabilidade não foi possível determinar os valores de K_d e $t_{1/2}$, uma vez que as condições experimentais não se adequaram a um modelo que descrevesse o processo de degradação das antocianinas.

15. Identificação dos compostos por LC-MS/MS

Os compostos identificados nos extratos aquosos de morango e de mirtilo dos ensaios de termo e foto-estabilidade apresentam-se nas tabelas 7, 8, 9 e 10 respetivamente. No anexo V encontram-se os seus cromatogramas iónicos e os respetivos espectros ESI(+)/MS². O perfil em antocianinas de ambos os extratos analisados diferiu nos ensaios de termo e foto-estabilidade, dado terem sido utilizados neste trabalho subprodutos de várias variedades de morango e de mirtilo. No ensaio de termo-estabilidade (figura 22) foram identificados três compostos maioritários no extrato de morango a pelargonodina-3-O-glucose ($T_r= 16,6$ min), a delphinidina-ferúlica ($T_r= 19,2$) e a cianidina-ferúlica ($T_r= 19,9$), visto que as suas áreas são maiores, tendo também sido identificadas outras antocianinas derivadas da cianidina. As antocianinas identificadas no ensaio de foto-estabilidade (figura 23) foram as mesmas, embora tenham apresentado tempos de retenção e áreas diferentes, excepto para a cianidina-3-O-malonil-glucose que não foi detetada.

Tabela 7 – Antocianinas e seus derivados identificados nos extratos aquosos de morango após ensaios de termo-estabilidade

		m/z								
		Iões fragmentados			Termo-estabilidade					
T _r (min)	Composto	[M] ⁺	MS ²	MS ³	T0	T1	T3	T4	T6	T8
15,9; 19,9	Cy-3-O-glucose isómeros	449	287	287	X	X	X	X	X	X
16,6	Pg-3-O-glucose	433	271	271	X	X	X	X	X	X
19,2	Dp-ferúlica	479	303	303	X	X	X	X	X	X
19,9	Cy-ferúlica	463	287	287	X	X	X	X	X	X
20,1	Desconhecido	493	317	317	X	X	X	X	X	X
20,4	Cy-3-O-malonil-glucose	535	287	287	X	X	X	X	X	X

Nota: Cy = cianidina; Dp = delphinidina; Pg= pelargonidina. T0: tempo inicial; T1: 50°C/60 min; T3: 57°C/102 min; T4: 75°C/60 min; T6: 93°C/18 min; T8: 100°C/60 min

Tabela 8 – Antocianinas e seus derivados identificados, nos extratos aquosos de morango, após ensaios de foto-estabilidade

		m/z			Foto-estabilidade			
		Iões fragmentados						
T _r (min)	Composto	[M] ⁺	MS ²	MS ³	T0	T3	T5	T7
15,2; 19,4	Cy-3-O-glucose isómeros	449	287	287	X	X	X	X
16,0	Pg-3-O-glucose	433	271	271	X	X	X	X
18,6	Dp-ferúlica	479	303	303	X	X	X	X
19,4	Desconhecido	479	317	317	X	X	X	X
19,5	Cy-ferúlica	463	287	287	X	X	X	X

Nota: Cy = cianidina; Dp = delphinidina;Pg= pelargonidina. T0: tempo inicial; T3: 8 dias; T5:22 dias; T7: 29 dias (dias de exposição à luz)

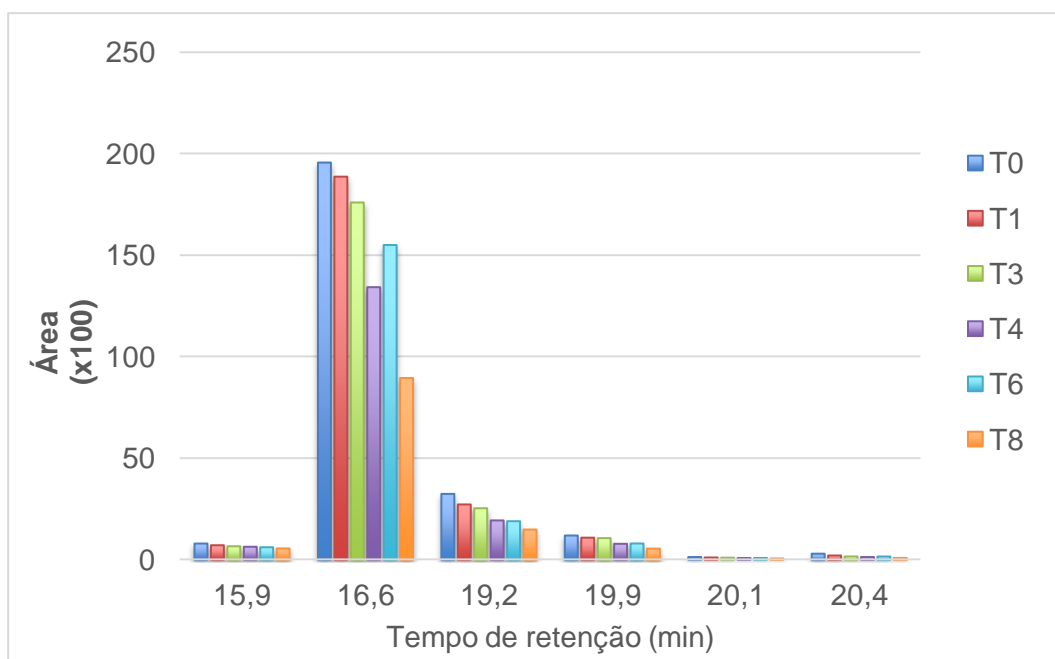


Figura 22 – Variação da área das antocianinas identificadas em função do tempo de retenção (min) nos extratos aquosos de morango após ensaios de termo-estabilidade

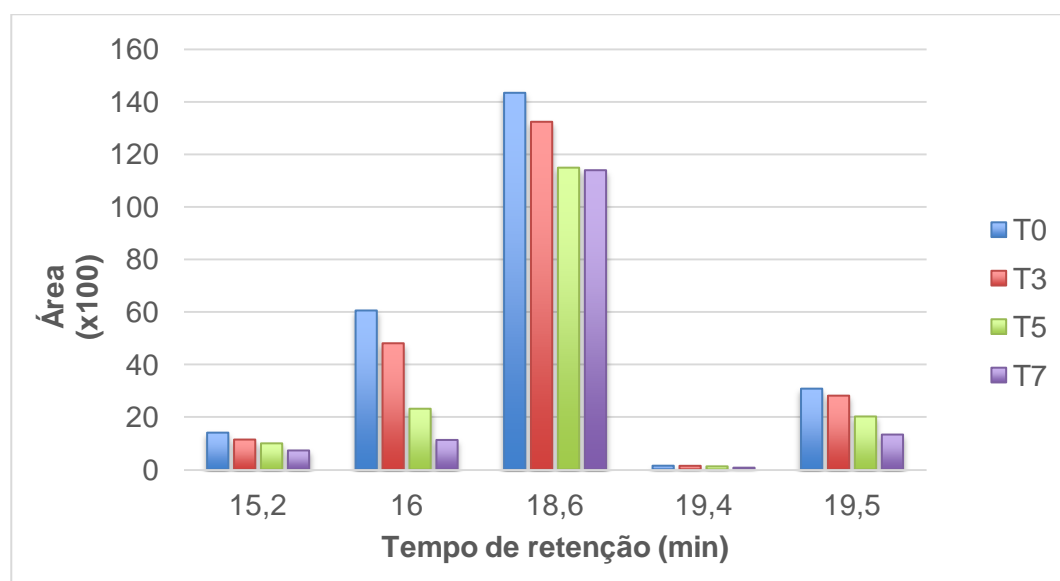


Figura 23 – Variação da área das antocianinas identificadas em função do tempo de retenção (min) nos extratos aquosos de morango após ensaios de foto-estabilidade

As principais antocianinas identificadas no extrato de mirtilo no ensaio de termo-estabilidade (figura 24) foram a malvidina-3-O-glucose ($T_r=17,0$ min) e a malvidina-3-O-pentose ($T_r=17,3$ min), tendo sido igualmente identificados derivados da cianidina, da petunidina e da

peonidina. No ensaio de foto-estabilidade (figura 25) a malvidina-3-O-glucose não foi detectada, sendo os compostos maioritários a malvidina-3-O-pentose e a malvidina -3-acetilglucose. Além da malvidina-3-O-glucose, houve outras antocianinas que foram identificadas no ensaio de termo-estabilidade mas que não foram detectadas na foto-estabilidade, como a cianidina-3-O-pentose, a peonidina-3-O – pentose e a petunidina-3-O-acetil-monoglucósido. No entanto, foram encontrados mais dois compostos a petunidina- 3-glucose e um derivado da delfinidina a delfinidina -3-acetil-glucose. Para alguns dos compostos detetados nos extratos de morango e de mirtilo não foi possível proceder-se a uma identificação da antocianina em causa. Esta é uma situação que ocorre frequentemente neste tipo de análise, decorrente da escassez de bases de dados e das muitas possibilidades de identificação.

Tabela 9 – Antocianinas e seus derivados identificados, nos extratos aquosos de mirtilo, após ensaios de termo-estabilidade

RT (min)	Composto	m/z Iões fragmentados			Termo-estabilidade					
		[M] ⁺	MS ²	MS ³	T0	T1	T3	T4	T6	T8
15,7	Cy-3-glucose	449	287	287	X	X	X	X	X	X
16,5	Cy-3-O-pentose	419	287	287	X	X	X	X	X	X
16,7	Pt-3-O-pentose	449	317	317	X	X	X	X	X	X
17,0	Mv-3-O-glucose	493	331	331	X	X	X	X	X	X
17,2	Pn-3-O - pentose	433	301	301	X	X	X	X	X	X
17,3	Mv-3-O-pentose	463	331	331	X	X	X	X	X	X
17,9	Cy-3-O-acetil-monoglucósido	491	287	287	X	X	X	X	X	X
18,0	Pt-3-O-acetil-monoglucósido	521	317	317	X	X	X	X	X	X
20,1	Desconhecido	449	303	303	X	X	X	X	X	X

Nota: Cy = cianidina; Mv = malvidina; Pn = peonidina; Pt = petunidina. T0: tempo inicial; T1: 50°C/60 min; T3: 57°C/102 min; T4: 75°C/60 min; T6: 93°C/18 min; T8: 100°C/60 min

Tabela 10 – Antocianinas e seus derivados identificados, nos extratos do mirtilo, após ensaios de foto-estabilidade

RT (min)	Composto	m/z			Foto-estabilidade			
		Iões fragmentados			T0	T3	T5	T7
		[M] ⁺	MS ²	MS ³				
14,9	Cy-3-glucose	449	287	287	X			
15,3	Pt- 3-glucose	479	317	317	X			
16,8	Mv-3-O-pentose	463	331	331	X	X	X	X
17,4	Cy-3-O-acetil-monoglucósido	491	287	287	X			X
18,1	Mv -3-acetilglucose	535	331	331	X	X	X	X
19,6	Desconhecido	449	303	303	X	X	X	X
20,0	Dp -3-acetil-glucose	507	303	303	X	X	X	X

Nota: Cy = cianidina; Dp = delfinidina; Mv = malvidina; Pn = peonidina; Pt = petunidina. T0: tempo inicial; T3: 8 dias; T5:22 dias; T7: 29 dias (dias de exposição à luz)

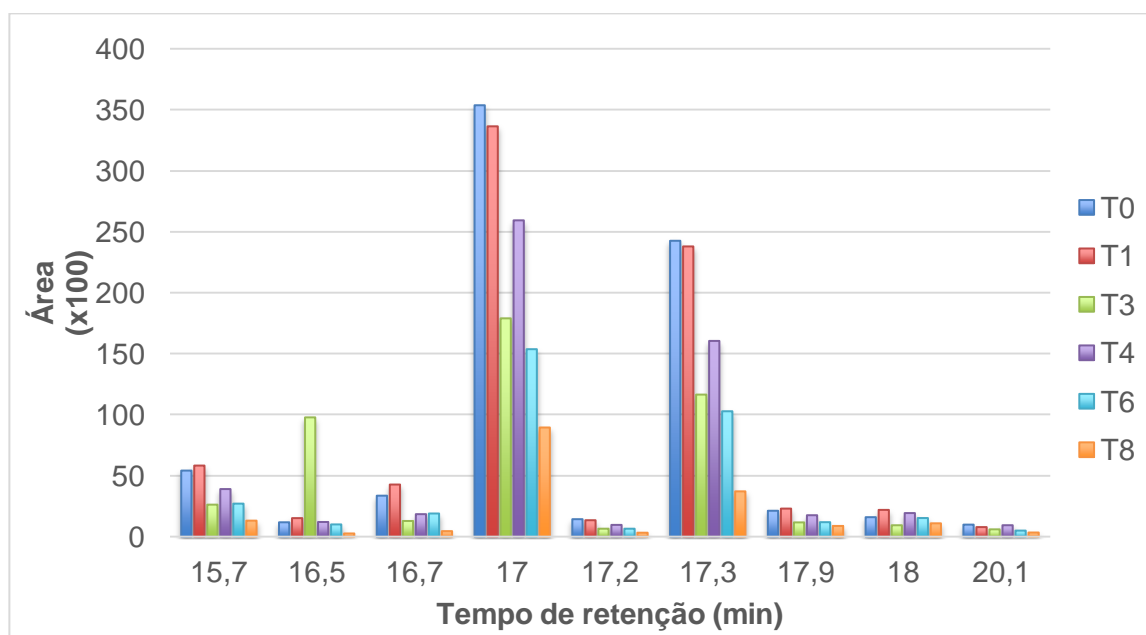


Figura 24 – Variação da área das antocianinas identificadas em função do tempo de retenção (min) nos extratos aquosos de mirtilo após ensaios de termo-estabilidade

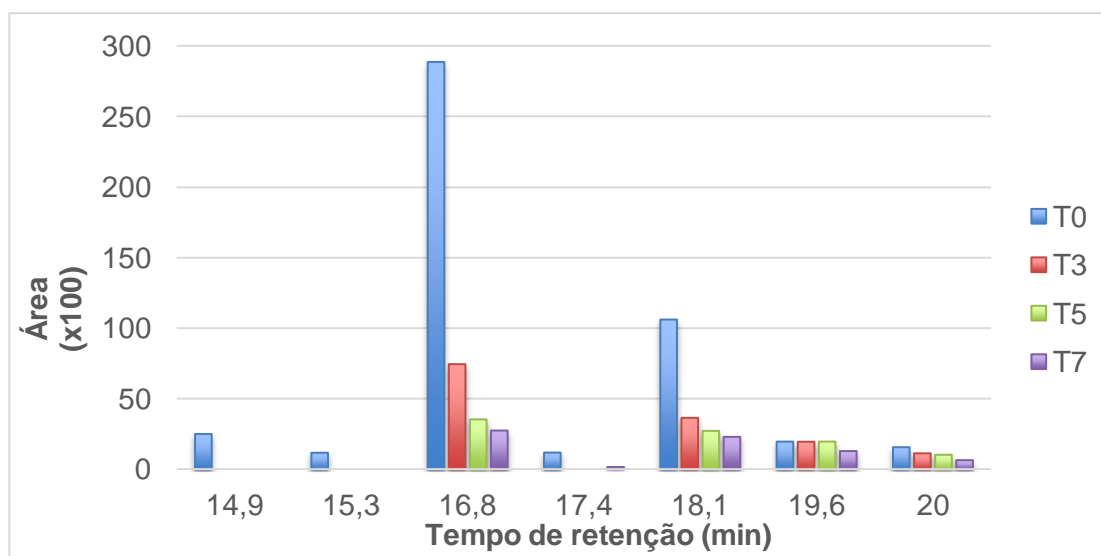


Figura 25 – Variação da área das antocianinas identificadas em função do tempo de retenção (min) nos extratos aquosos de mirtilo após ensaios de foto-estabilidade

Relativamente à termo-estabilidade verifica-se que os compostos identificados nos extratos de morango e de mirtilo permanecem nas várias condições de temperatura e de tempo a que foram submetidos (tabela 7 e 9), o que indica que não ocorreu uma degradação completa das antocianinas. No entanto, observa-se uma diminuição da área dos compostos identificados. O facto de, para o mesmo composto, não haver um decréscimo constante da área (figura 22 e 24) deve-se às condições experimentais utilizadas serem muito diferentes, no qual se fez variar a temperatura e o tempo. As condições de temperatura e tempo que causaram menos degradação dos compostos no extrato de morango foram 50°C e 60 min (T1), 57°C e 102 min (T3) e 93°C e 18 min (T6), para o extrato de mirtilo as condições foram 50°C e 60 min (T1) e 75°C e 60 min (T4). A pelargonidina-3-O-glucose (um dos compostos maioritários) presente no extrato de morango sofreu uma redução de área de 54% enquanto que a área da malvidina-3-O-pentose (um dos compostos maioritários) identificada no extrato de mirtilo diminuiu 85%.

Quanto à foto-estabilidade (tabela 8 e 10) verifica-se igualmente que para o extrato de morango os compostos identificados permanecem ao longo do tempo de exposição à luz, já para o extrato de mirtilo alguns dos compostos identificados deixaram de ser detectados após 8 dias (T3) na presença de luz. No extrato de morango (figura 23) observa-se uma diminuição gradual das áreas dos compostos identificados ao longo do tempo enquanto que para o extrato de mirtilo (figura 25) observa-se um decréscimo drástico nos primeiros dias de exposição à luz. Os compostos identificados no extrato de morango sofreram uma menor degradação nas condições em que estão até 8 dias na presença de luz (T3), para o extrato de mirtilo os compostos são degradados logo após o tempo inicial (T0). A presença de luz

conduziu a um decréscimo da área da pelargonidina-3-O-glucose (extrato de morango) em 81% e da malvidina-3-O-pentose (extrato de mirtilo) em 90%.

Observando os resultados obtidos verifica-se que a área dos compostos identificados, em ambos os extratos, sofre uma maior redução na presença de luz do que quando sujeito a temperaturas elevadas, indicando que a luz tem um efeito mais degradativo nas antocianinas.

Nas figuras 26, 27, 28 e 29 estão representados os varrimentos dos extratos de morango e de mirtilo sujeitos às diferentes condições de temperatura, tempo e luz. Nestes resultados também é possível observar uma diminuição das antocianinas, que consequentemente, leva a uma degradação da cor.

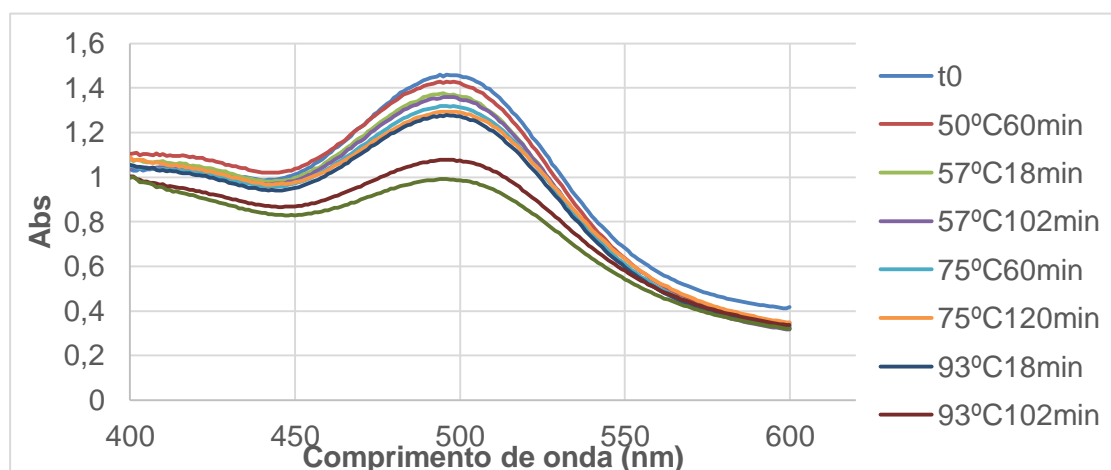


Figura 26 – Varrimento a 500 nm dos extratos aquosos de morango submetidos a diferentes binómios de temperatura e de tempo de tratamento

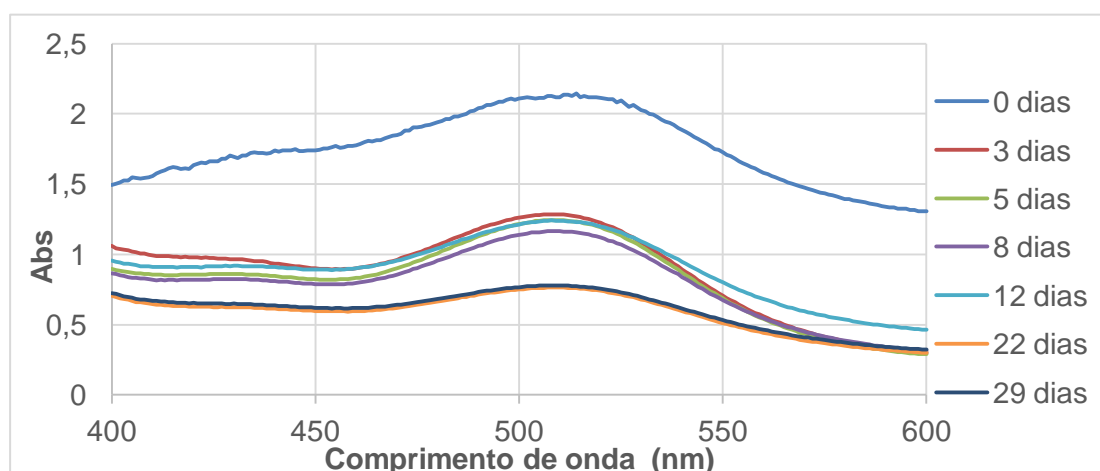


Figura 27 – Varrimento a 500 nm dos extratos aquosos de morango ao longo do tempo de exposição à luz

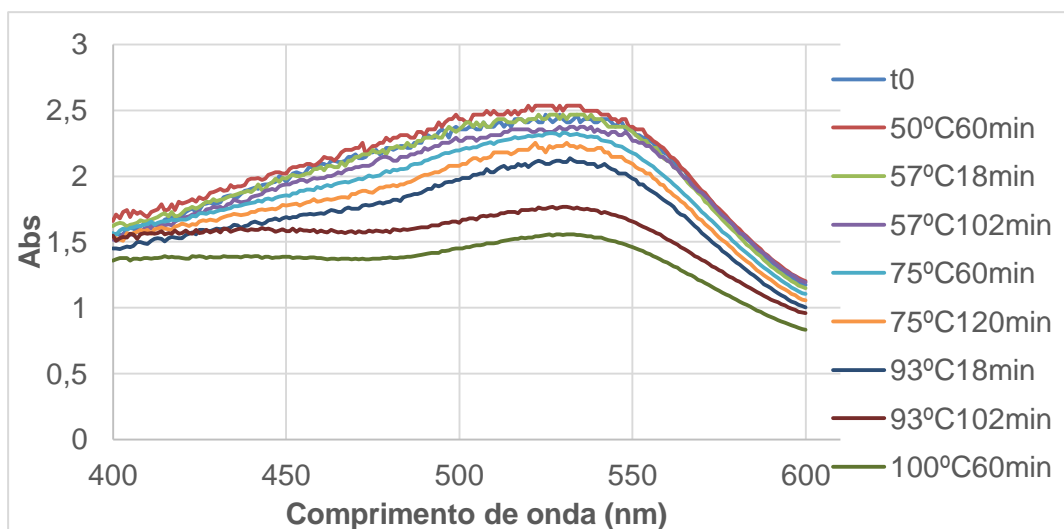


Figura 28 – Varrimento a 500 nm dos extratos aquosos de mirtilo submetido a diferentes binômios de temperatura e de tempo de tratamento

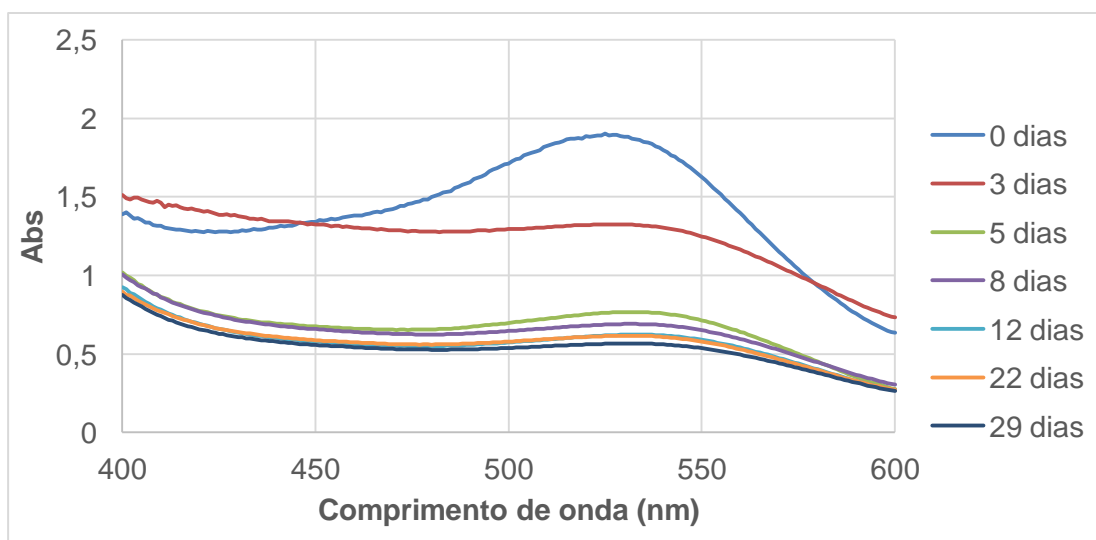


Figura 29 – Varrimento a 500 nm dos extratos aquosos de mirtilo ao longo do tempo de exposição à luz

16. Avaliação da capacidade antioxidante e do teor de antocianinas totais

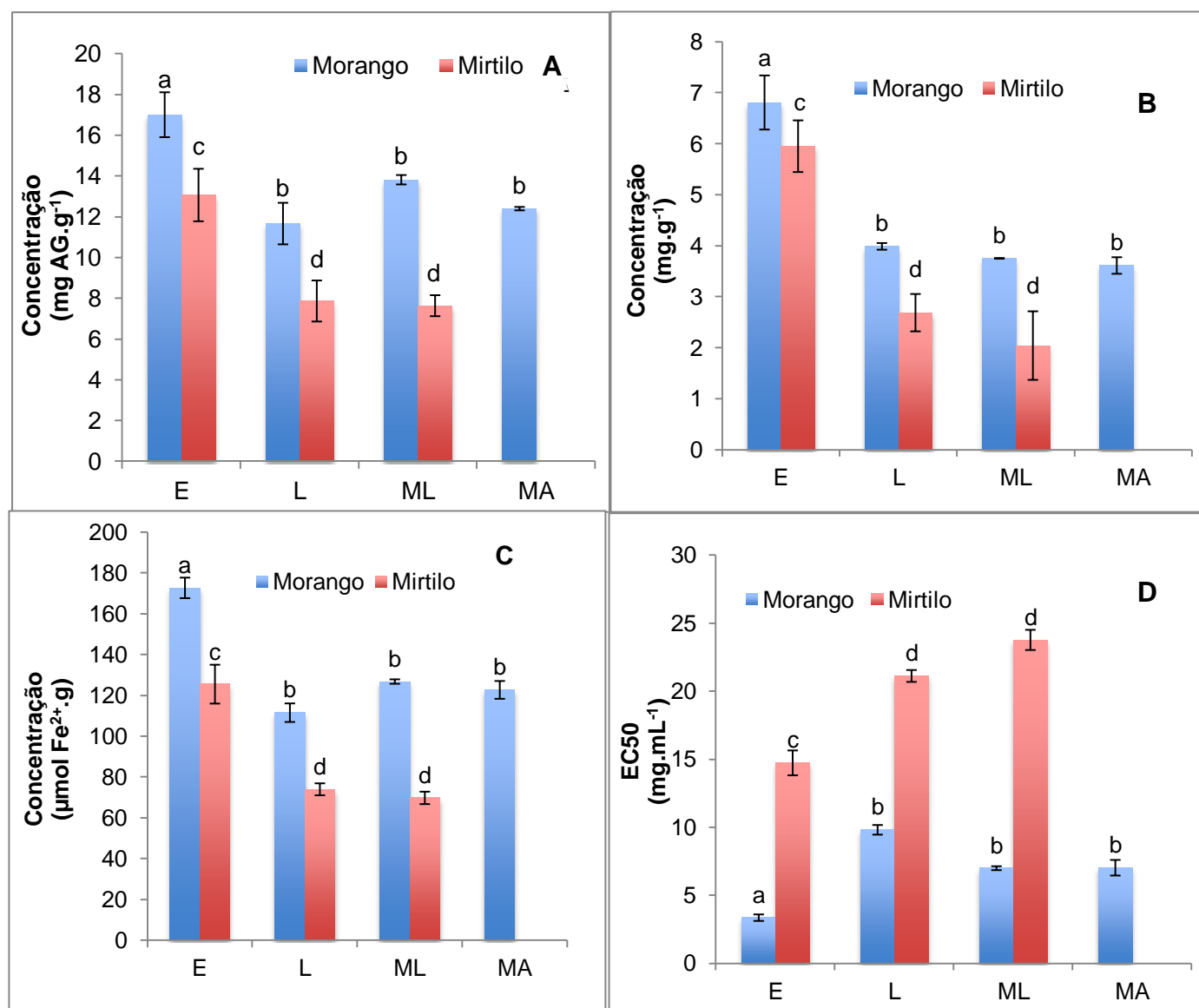


Figura 30 – Teor de compostos fenólicos totais (A), teor de antocianinas totais (B) e atividade antioxidante pelos métodos FRAP (C) e DPPH (D) do extrato aquoso, do liofilizado e dos microencapsulados de morango e de mirtilo. Valores médios \pm desvio-padrão, excepto para o DPPH. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Legenda: E – extrato aquoso; L – liofilizado; ML – microencapsulado por liofilização; MA – microencapsulado por atomização.

O teor de compostos fenólicos totais (figura 30 A) obtido para o extrato aquoso, liofilizado e microencapsulados liofilizado e atomizado de morango foi de 17,01, 11,67, 13,82 e 12,40

mg AG.g⁻¹ r.s, respetivamente. Para o mirtilo os valores obtidos foram 13,07, 7,87 e 7,64 mg AG.g⁻¹ r.s, para o extrato aquoso, liofilizado e microencapsulado por liofilização. Resultados semelhantes foram obtidos por Takikawa, *et. al* (2012) e Huang (2012) para os extratos de morango e de mirtilo.

Em relação ao teor de antocianinas totais (figura 30 B) os valores obtidos para o morango, segundo a ordem anterior, foram 6,81, 3,99, 3,75 e 3,61 mg pelargonidina-3-glucósido.g⁻¹ r.s, tendo-se obtido para o mirtilo valores de 5,95, 2,69 e 2,04 mg malvidina-3-glucósido.g⁻¹ r.s. Neste estudo o extrato de morango apresentou um resultado superior ao observado por Henríquez, *et al.* (2011) (5 mg.g⁻¹), tendo o mirtilo apresentado um resultado inferior ao encontrado por Kalt & Dufour (1997) (entre 6,70 e 23,76 mg.g⁻¹).

Quanto à atividade antioxidante, de acordo com o método FRAP (figura 30 C), os valores obtidos para o morango, pela ordem anteriormente mencionada, foram de 172,50, 111,32, 126,59 e 122,50 µmol Fe²⁺.g⁻¹ r.s. Para o mirtilo observaram-se valores de 125,31, 73,77 e 66,57 µmol Fe²⁺.g⁻¹ r.s. Os resultados obtidos para os extratos de morango e mirtilo foram diferentes dos observado por Henríquez, *et. al*, (2011) (132 e 134 µmol Fe²⁺.g⁻¹ r.s, para o morango e mirtilo, respetivamente). Segundo o método DPPH (figura 30 D) foram obtidos valores de EC₅₀ de 3,33, 9,79, 6,97 e 7,00 mg.mL⁻¹ para o extrato aquoso, liofilizado e microencapsulado liofilizado e atomizado de morango, respetivamente. Os valores obtidos para o extrato aquoso, liofilizado e microencapsulado de mirtilo foram 14,71, 21,10 e 23,75 mg. mL⁻¹, respetivamente.

Comparando os resultados obtidos (Anexo VI) verifica-se que a liofilização e a microencapsulação por liofilização e atomização provocou nos extratos aquosos de morango e de mirtilo uma diminuição significativa (p>0,05) do teor de compostos fenólicos totais, teor de antocianinas totais e capacidade antioxidante. Não foram observadas diferenças significativas (p<0,05) nos parâmetros avaliados entre a liofilização com e sem adição de inulina, não tendo sido igualmente observadas diferenças significativas (p<0,05) entre os dois métodos de microencapsulação utilizados (liofilização e atomização), indicando que ambos conferem uma boa proteção. No entanto, os resultados obtidos relativamente aos microencapsulados podem não corresponder aos valores reais uma vez que não ocorreu uma solubilização total da fração corante durante o processo de hidratação, o que por sua vez pode ter levado a uma libertação incompleta.

Farinha (2014) estudou o efeito da liofilização com e sem adição de goma arábica na composição bioativa de extratos de morango e de kiwi e também não observou diferenças

significativas na preservação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante, tendo este processo levado a uma perda de compostos bioativos.

17. Análise morfológica das microcápsulas

Comparando as imagens das microcápsulas de morango formadas por atomização e por liofilização (figuras 31 e 32) verifica-se que os dois processos de microencapsulação originam microcápsulas com morfologias muito distintas.

As microcápsulas formadas por atomização (figura 31), apresentam uma forma esférica, com uma superfície lisa, de parede contínua sem fissuras. No entanto, também se podem observar algumas microcápsulas enrugadas e com concavidades. A figura 31 B mostra o interior de uma microcápsula onde se pode verificar que as microcápsulas obtidas por atomização são ocas e possuem uma parede espessa e consistente. Beirão-da-Costa, *et al.* (2013) observaram morfologias semelhantes em microcápsulas de inulina com óleo de orégão obtidas por atomização.

A morfologia das microcápsulas de morango e de mirtilo formadas por liofilização é semelhante (figuras 32 e 33). Ambas as microcápsulas exibem uma forma aproximadamente esférica, apresentando as microcápsulas de mirtilo uma forma mais irregular. Estas microcápsulas apresentam ainda uma superfície rugosa de aspeto esponjoso com fissuras, com tendência para a formação de aglomerados. A presença de fissuras pode ser uma desvantagem, uma vez que pode comprometer o efeito protetor das microcápsulas e/ou levar a uma libertação antecipada do composto de interesse.

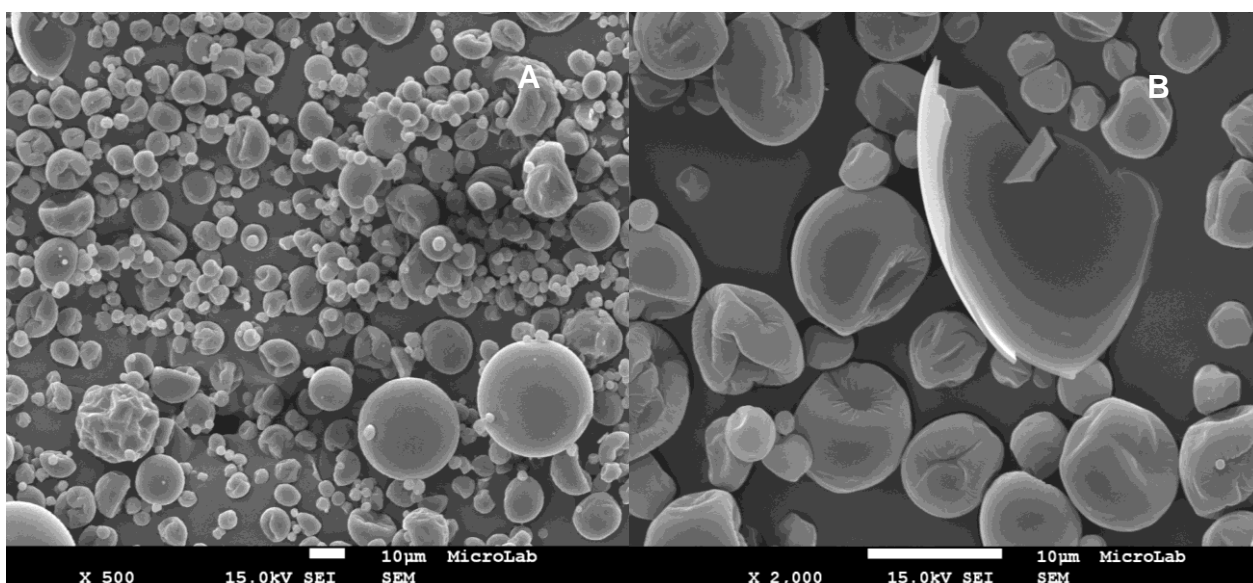


Figura 31 – Imagens obtidas por SEM das microcápsulas de morango formadas por atomização. Ampliação (A): 500 x (B): 2000 x

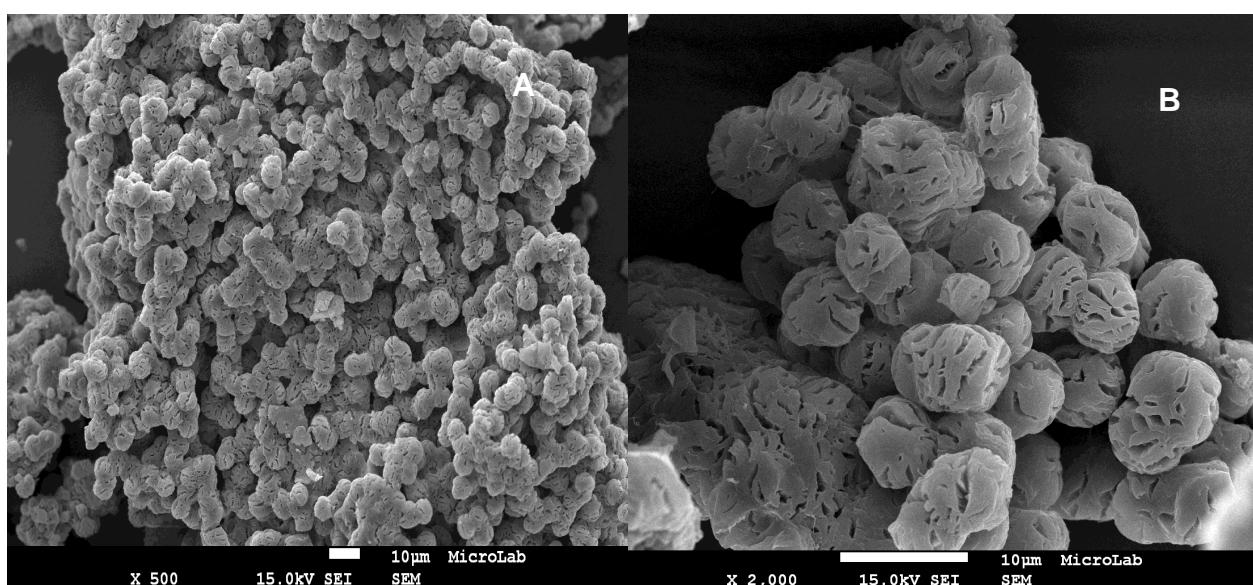


Figura 32 – Imagens obtidas por SEM das microcápsulas de morango formadas por liofilização. Ampliação (A): 500 x (B): 2000 x

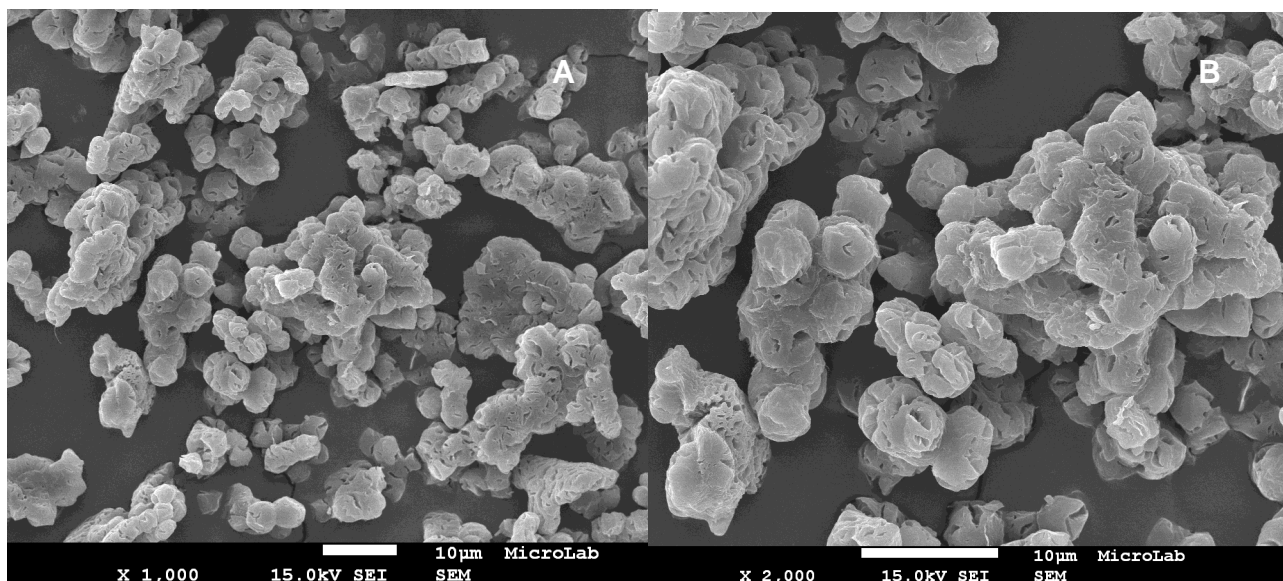


Figura 33 – Imagens obtidas por SEM das microcápsulas de mirtilo formadas por liofilização. Ampliação (A): 1000 x (B): 2000 x

Relativamente à distribuição de tamanho das microcápsulas, verifica-se que as microcápsulas de morango produzidas por atomização (figura 34) apresentam uma gama de tamanhos alargada que varia entre 1,4 e 12,9 μm , possuindo 80% das microcápsulas um diâmetro inferior a 7,7 μm . O diâmetro médio é de 5,5 μm .

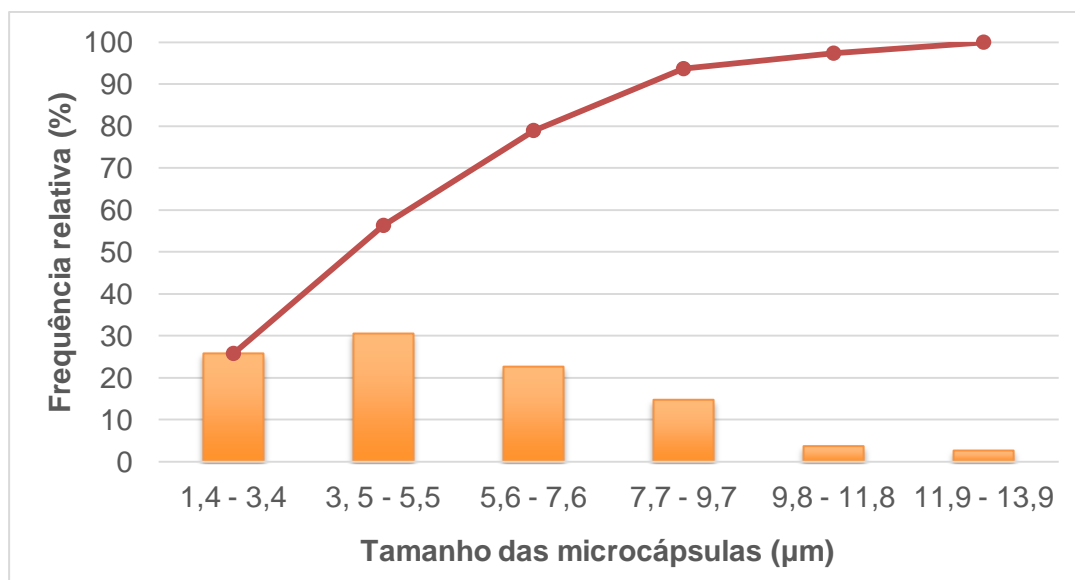


Figura 34 – Distribuição do tamanho das microcápsulas de morango formadas por atomização

As microcápsulas de morango obtidas por liofilização (figura 35) apresentam uma variedade de tamanhos mais pequena quando comparada com as microcápsulas produzidas por atomização. O tamanho das microcápsulas liofilizadas varia entre 5,5 e 8,8 μm , tendo cerca de 80% das microcápsulas produzidas apresentado um diametro inferior 7,2 μm . O diâmetro médio é de 6,6 μm , sendo este superior ao obtido para as microcápsulas obtidas por atomização.

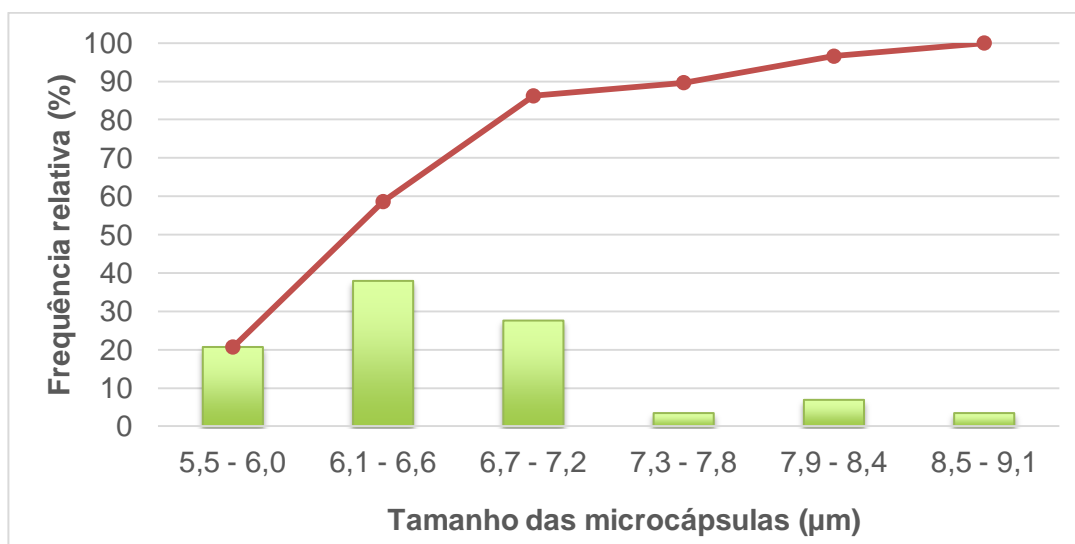


Figura 35 – Distribuição do tamanho das microcápsulas de morango formadas por liofilização

IV. Conclusões

O presente estudo permitiu tirar as seguintes conclusões:

- É possível extrair elevadas proporções de antocianinas utilizando água como solvente, à temperatura ambiente, sob agitação durante 15 minutos.
- A cor e o teor de antocianinas dos extratos aquosos de morango e de mirtilo são significativamente degradados quando sujeitos a temperaturas elevadas (cerca de 100°C) em menos de 1 h, sendo a temperatura a variável com efeito mais expressivo na degradação das antocianinas.
- A presença de luz também conduz a uma degradação significativa da cor e do teor de antocianinas levando a uma perda de 59% e 88% do total de antocianinas nos extratos aquosos de morango e de mirtilo, respetivamente, ao fim de 29 dias. Os extratos de morango ($t_{1/2}$ = 24 dias) apresentaram maior estabilidade na presença de luz em relação aos de mirtilo ($t_{1/2}$ = 22 dias).
- A análise por LC-MS/MS confirmou que a luz provoca uma maior degradação das antocianinas, e consequentemente da cor, dos extratos aquosos relativamente à temperatura, tendo sido identificadas como antocianinas maioritárias a pelargonidina-3-O-glucose, a delphinidina-ferúlica e a cianidina-ferúlica no extrato de morango e a malvidina-3-O-glucose, a malvidina-3-O-pentose e malvidina -3-acetilglucose no extrato de mirtilo.
- A liofilização direta dos extratos bem como a microencapsulação destes em inulina por liofilização e atomização provocou uma diminuição significativa dos teores de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e da capacidade antioxidante, não se tendo verificado diferenças significativas entre os extratos liofilizados com e sem inulina bem como entre os dois métodos de microencapsulação.
- A microencapsulação por atomização produz microcápsulas com uma forma esférica de superfície lisa e sem fissuras enquanto que a microencapsulação por liofilização forma microcápsulas com uma forma mais irregular de superfície rugosa e com fissuras.
- A microencapsulação por liofilização conferiu uma boa proteção e estabilidade da cor à luz, não ocorrendo variações nos parâmetros da cor ao longo de 29 dias, sendo um processo promissor no melhoramento da estabilidade de corantes naturais para serem utilizados em alimentos expostos à luz.

Para trabalhos futuros sugere-se:

- Avaliar a termo-estabilidade dos microencapsulados obtidos, que não foi feita neste trabalho por não haver amostra suficiente para realizar os ensaios;
- Produzir microcápsulas utilizando outros agentes encapsulantes, para fins de comparação;
- Estudar a aplicabilidade dos microencapsulados em matrizes alimentares cujos processos/armazenamento envolvam tratamentos térmicos e/ou exposição à luz.

V. Bibliografia

Aaby, K., Skrede, G. e Wrolstad, R. 2005. Phenolic Composition and Antioxidant Activities in Flesh and Achenes of Strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4032-4040.

Aherne, A. S. e O'Brien, M. N. 2002. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition*. 18: 75-81.

Almeida, D. 2006. *Manual de Culturas Hortícolas – Volume II*. 1ª Edição. Lisboa. Editorial Presença. 325 p.

Andersen, M. Ø. e Markham, R. K. 2006. *Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications*. 1ª edição. CRC Press. Nova Iorque. 1212 p.

Azeredo, H.M.C. 2005. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e nutrição*. 16(1): 89-97.

Barnes, S. J., Nguyen, P. H., Shen, S. e Schug, A. K. 2009. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electro ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216: 4728-4735.

Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Januário M. I. N., Vicente, A. A., Beirão-da-Costa, M. & Delgadillo, I. 2013. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil. *Food Hydrocolloids*. 33:199-206.

Cabrita, L. e Chaves das Neves, H. 2003. Análise e identificação das antocianinas do mirtilo da Madeira (*Vaccinium padifolium*) e do mirtilo dos Açores (*Vaccinium cillyndraceum*). Sociedade Portuguesa de Química – Atas do 6º Encontro de Química de Alimentos – Volume II. 619-622.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M., Rodríguez, J. A. e Galán-Vidal, C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 113: 859-871.

Cavalcanti, N. R., Santos, T. D. e Meireles, A. A. M. 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Research International*. 44: 499–509.

Cerezo, B. A., Cuevas, E., Winterhalter, P., Garcia-Parilla, M. C. e Troncoso, A. M. 2010. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chemistry*. 123: 574–582.

Chopra, K. H. e Panesar, P. S. 2010. *Food Chemistry*. 1ª edição. Alpha Science International. Oxford. 569 p.

Connor, M. A., Luby, J. J. e Tong, B. S. C. 2002. Variability in Antioxidant Activity in Blueberry and Correlations among Different Antioxidant Activity Assays. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 127(2): 238-244.

Consulai. 2014. O mercado dos pequenos frutos. Disponível em: https://issuu.com/consulai/docs/o_mercado_dos_pequenos_frutos. Acesso em: 04/04/2016.

Cook, N. C. e Samman, S. 1996. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 7: 66-76.

Desai, K. e Park, H. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*. 23: 1361-1394.

Fang, Z. e Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*. 21: 510-523.

Fang, Z. E Bhandari, B. 2012. Spray drying, freeze drying and related processes for food ingrediente and nutraceutical encapsulation. In: Garti, N. e McClements, D. J. *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredientes and nutraceuticals*. Woodhead Publishing. Cambridge. 73-102 p.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 04/04/2016.

Farinha, P. M. D. 2014. Efeito da liofilização e da adição de goma arábica no potencial bioativo de extratos de morango e kiwi. Tese de mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. Instituto Politécnico de Castelo Branco – Escola Superior Agrária. 86 p.

Franck, A. 2006. Inulin. *In: Stephen, M. A., Phillips, G. O. e Williams, P. A. Food Polysaccharides and Their Applications*. CRC Press. Nova Iorque. 335-351 p.

Galanakis, C. M. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*. 26: 68-87.

Galanakis, C. M. 2015. *Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques*. 1ª edição. Academic Press. Nova Iorque. 414 p.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voille, A. e Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. 40: 1107–1121.

Gavrilova, V., Kajdzanoska, M., Gjamovski, V. e Stefova, M. 2011. Separation, Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Blueberries and Red and Black Currants by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 4009-4018.

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, M. J., Quiles, L. J., Mezzetti, B. e Battino, M. 2012. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition Journal*. 28(1): 9-19.

Goiffon, J. P., Mouly, P. P. e Gaydou, M. E. 1999. Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 382: 36-50.

Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R. & Meybeck, A. 2011. Global food losses and Food waste. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1-23.

Henríquez, C., López-Alarcón, C, Gómez, M, Lutz, M & Speisky, H. (2011). Time-dependence of Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) index in Chilean apples and berries. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 61: 323-332.

Huang, W., Zhang, H., Liu, W. e Li, C. 2012. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University - SCIENCE B*. 13 (2): 94-102.

INE – Instituto Nacional de Estatística. 2014. Estatísticas agrícolas 2013. Portugal: Instituto Nacional de Estatística.

Jiménez-Aguilar, D. M., Ortega-Regules, A. E., Lozada-Ramírez, J. D., Pérez-Pérez, M. C. I., Vernon-Carter, E. J. & Welti-Chanes, J. 2011. Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:889-894.

Kalt, W. e McDonald, E. J. 1996. Chemical Composition of Lowbush Blueberry Cultivars. *Journal of American Society for Horticultural Science*. 121(1): 142-146.

Kalt, W. e Dufour, D. 1997. Health functionality of blueberries. *HortTechnology*. 7:216-221.

Kandansamy, K. e Somasundaram, P. D. 2012. Microencapsulation of Colors by Spray Drying – A Review. *International Journal of Food Engineering*. 8(2): 1-15.

Lopes-da-Silva, F., Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J. e Santos-Buelga, C. 2002. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *European Food Research and Technology*. 214(3): 248-253.

Lorentzen, J. 1981. Freeze drying: the process, equipment and products. *In: Thorne, S. Developments in Food Preservation – 1*. Applied Science. Londres. 153 – 175 p.

Mafart, P. 1994. *Ingeniería industrial alimentaria. Volume 1 - Procesos físicos de conservación*. 1ª edição. Zaragoza. Acribia. 297 p.

Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpoor E e Dehnad, D. 2016. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatina. *International Journal of Biological Macromolecules*. 85: 379-385.

Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M. e Assadpoor, E. 2014. Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review. *Drying Technology*. 32(5): 509-518.

Markakis, P. 1982. Stability of Anthocyanins in Food. *In: Markakis, P. Anthocyanins as Food Colors*. Academic Press. Nova Iorque. 163-178 p.

Mirabella, N., Castellani, V. e Sala S. 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*. 65: 28-41.

Montgomery, D. C. 1991. Response Surface Methods and Designs in: *Design and Analysis of Experiments*. 8ª edição. John Wiley & Sons. 478 – 544 p.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. e Bugarski, B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. 1: 1806-1815.

Nicoueä, E. E., Savard, S. e Belkacemi, K. 2007. Anthocyanins in Wild Blueberries of Quebec: Extraction and Identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 5626-5635.

Oancea, S., Stoia, M. e Coman, D. 2012. Effects of extraction conditions on bioactive anthocyanin content of *Vaccinium corymbosum* in the perspective of food applications. *Procedia Engineering*. 42: 489-495.

Oetjen, G. W. e Haseley, P. 2004. *Freeze-Drying*. 2ª Edição. Weinheim. Wiley-VCH. 395 p.

Özkan, G. e Bilek, S. E. 2014. Microencapsulation of natural food colourants. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 3(3): 145-156.

Palha, M. G. 2005. A planta do morangueiro. *In: Palha, M. G. Manual do morangueiro*. AGRO. Oeiras. 3-12 p.

Pap, N., Pongrácz, E., Myllykoski, L. e Keiski, R. L. 2014. Waste minimization and utilization in the food industry: Valorization of food industry wastes and by-products. *In: Sahu, J. K. Introduction to Advanced Food Processing Engineering*. CRC Press. Nova Iorque. 595-630 p.

Patras, A., Brunton, P. N., O'Donnell, C. e Tiwari, B. K. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*. 21: 3-11.

Pegg, R. B. e Shahidi, F. 2007. Encapsulation, Stabilization, and Controlled Release of Food Ingredients and Bioactives. *In: Rahman, M. S. Handbook of Food Preservation*. CRC Press. Nova Iorque. 509-568 p.

Pintado, M. E. e Teixeira, J. A. 2015. Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia*. 2 (6): 10-12 p.

Prior, L. R., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. e Mainland, M. 1998. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of Vaccinium Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 2686-2693.

Rein, M. 2005. *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. Dissertação Académica. Faculdade de Agricultura e Pescas, Universidade de Helsínquia. 87 p.

Ribeiro, E. P. e Seravalli, E. A. G. 2007. *Química de Alimentos*. 2ª Edição. Edgard Blücher. São Paulo. 184 p.

Robards, K., Prenzler, D. P., Tucker, G., Swatsitang, P. e Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 66: 401-436.

Rodriguez-Amaya, D. 2016. Natural food pigments and colorants. *In: Marangoni, G. A. Food chemistry and biochemistry*. Current Opinion in Food Science – Elsevier. 7: 20-26.

Sanguansri, L. e Augustin, M. A. 2010. Microencapsulation in functional food product development. *In: Smith, J. e Charter, E. Functional Food Product Development*. Wiley-Blackwell. 1-23 p.

Serrado, F., Pereira, M., Freitas, S., Martins, S. e Dias, T. 2008. Mirtilos: guia de boas práticas para produção, promoção e comercialização. ADRIMAG. 80 p.

Schieber, A., Stintzing, F. C. e Carle, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science & Technology*. 12: 401-413.

Silva, L. P., Escribano-Bailón, T. M., Alonso, P. J. J., Rivas-Gonzalo, C. J. e Santos-Buelga, C. 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology*. 40(2): 374-382.

Sousa, B. M. 2007. Mirtilo: Qualidade pós-colheita. AGRO. Oeiras. 34 p.

Takikawa, A. Y., Rampazzo, V. & Haminiuk, C. W. I. (2012). Estudo in vitro da capacidade antioxidante e compostos fenólicos de extratos de frutas vermelhas. Seminário de Iniciação Científica e tecnológica da UTFPR.

Tan, M. C., Tan, C. P. e Ho, C. W. 2013. Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. *International Food Research Journal*. 20: 3117-3123.

Tulipani, S., Mezzetti, B., Capocasa, F., Bompadre, S., Beekwilder, J., Ric De Vos, C. H., Capanoglu, E., Bovy, A. e Battino, M. 2008. Antioxidants, Phenolic Compounds, and Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 696–704.

Van Dyk, J. S., Gama, R., Morrison, D., Swart, S. e Pletschke B. I. 2013. Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilization of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 26: 521-531.

Vermerris, W. e Nicholson, R. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. 1ª edição. Springer. 284 p.

Wang, B. C., He, R. e Li, Z. M. 2010. The Stability and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Blueberry. *Food Technology and Biotechnology*. 48(1): 42-49.

Wang, W., Jung, J., Tomasino, E. e Zhao, Y. 2016. Optimization of solvent and ultrasound-assisted extraction for different anthocyanin rich fruit and their effects on anthocyanin compositions. *Food Science and Technology*. 72: 229-238.

Wang, S.Y. e Lin, H. S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 140–146.

Wouters, R. 2010. Inulin. *In: Imeson, A. Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. Wiley-Blackwell. 180-197 p.

Wroslstad, E. R. 1976. Color and Pigment Analyses in Fruit Products. Oregon State University Agricultural Experiment Station bulletin. 624: 1-17.

Zhao. 2007. *Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion*. 1ª edição. CRC Press. Nova Iorque. 442 p.

Anexo I

Impacto do microencapsulamento na estabilidade do corante natural obtido a partir dos sub-produtos do morango e do mirtilo

Joana Gomes¹, Carmo Serrano² Conceição Oliveira³ & Margarida Moldão¹

¹LEAF / Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, ²Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Tecnologia e Segurança Alimentar (UEISTSA), Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. Av. da República, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, ³Centro Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 1049-001 Lisboa.

Resumo

Os frutos vermelhos como o mirtilo e o morango muitas vezes não podem ser comercializáveis para fresco devido à sua elevada perecibilidade, podendo constituir matéria-prima para extração de corantes naturais para fins alimentares. Estes frutos têm na sua constituição antocianinas que são pigmentos responsáveis pela cor vermelha ou azul e que apresentam elevada atividade antioxidante. Contudo, a sua utilização como corantes tem sido limitada devido à baixa estabilidade durante o processamento e armazenamento dos alimentos em que são aplicados. Neste trabalho estudou-se o efeito da temperatura e da luz nas características dos extratos aquosos de morango e mirtilo. Para estudar o efeito da microencapsulação na estabilidade da cor, procedeu-se à secagem dos extratos por liofilização e *spray-drying* utilizando a inulina como agente encapsulante. A análise dos resultados permite observar que a temperatura é a variável com efeito mais significativo na degradação das antocianinas e da cor dos extratos de morango e mirtilo, sendo que temperaturas mais elevadas conduzem a maior degradação. O microencapsulamento por *spray-drying* e por liofilização altera significativamente a cor original dos extratos permitindo, no entanto, manter a respetiva cor ao longo do tempo de exposição à luz, contrariamente ao que se verifica com os extratos. A microencapsulação afigura-se promissora para a utilização de corantes naturais em alimentos processados pelo calor e/ou expostos à luz.

Palavras-chave: antocianinas, cor, termo e foto-estabilidade, liofilização, *spray-drying*

Abstract

The small fruits like strawberry and blueberry can't often be marketed for fresh due its high perishability, and may constitute material for extraction of natural colorants for food purposes. These fruits have in their constitution anthocyanins that are pigments responsible for the red or blue color and have high antioxidant activity. However, their use as colorants has been limited due to the low stability during the processing and storage of foods in which they are applied. The aim of the presente work was to studied the effect of temperature and light on the characteristics of aqueous extracts of strawberry and blueberry. To study the effect of the microencapsulation in the stability of the color, the extracts were drying by freeze-drying and spray-drying using inulin as wall material. The results showed that temperature is the variable with the most significant effect on degradation of anthocyanins and the color of strawberry and blueberry extracts, and higher temperatures lead to increased of degradation. Microencapsulation by spray-drying and freeze-drying significantly changes the original color of extracts allowing, however, to maintain the respective color over time light exposure, contrary to what happens with the extracts. Microencapsulation looks promising for the use of natural colorants for food processed by heat and/or exposed to light.

Key words: anthocyanins, colorant, temperature and Light stability, freeze-drying, spray-drying

Introdução

A indústria agro-alimentar gera uma grande quantidade de subprodutos que são muitas vezes considerados “lixo” (Galanakis, 2015). Segundo Gustavsson, *et al.* (2011), nas regiões desenvolvidas, como a Europa, a América do Norte e a Oceânia, as perdas no sector primário representam uma % considerável do total de subprodutos gerados ao longo da cadeia. Estas perdas ocorrem devido a danos mecânicos ocasionados durante as operações de colheita, condições climáticas adversas, doenças e pragas que afetam as culturas e factores económicos (regulamentos e padrões estéticos e de qualidade exigidos pelo mercado) (Galanakis, 2015). Nesse sentido, a valorização de subprodutos alimentares apresenta-se, não só como uma necessidade, mas também como uma oportunidade para a obtenção de novos produtos de valor acrescentado (Pintado & Teixeira, 2015). O morango e o mirtilo são frutos ricos em compostos antioxidantes, fibra dietética, vitaminas C, A e E, potássio e cálcio, podendo os seus subprodutos ser recuperados para diversos fins na indústria alimentar ou outras. Estes frutos apresentam na sua constituição antocianinas que são compostos hidrossolúveis responsáveis pela cor vermelha e azul (Cavalcanti *et al.*, 2011). Atualmente, tem-se verificado um crescente interesse por estes pigmentos devido a uma tendência para o desenvolvimento de corantes alimentares a partir de fontes naturais como alternativa aos corantes sintéticos, e também devido à sua elevada atividade antioxidante (Mahdavi *et al.*, 2016). Apesar das antocianinas apresentarem uma potencial aplicação como corantes naturais a sua utilização tem sido limitada devido à sua baixa estabilidade durante o processamento e armazenamento à temperatura, luz, oxigénio, presença de iões metálicos e atividade enzimática (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). A microencapsulação afigura-se como um processo eficiente na estabilização de materiais facilmente degradáveis (Mahdavi *et al.*, 2016). A secagem por *spray-drying* é o método mais utilizado para a microencapsulação de antocianinas por ser simples, rápido e contínuo originando partículas de elevada estabilidade (Pegg & Shahidi, 2007). A secagem por liofilização também é um método eficiente que opera a baixas temperaturas sendo adequando para compostos sensíveis ao calor (Mahdavi *et al.*, 2016). Neste trabalho estudou-se (i) o efeito da temperatura e da luz na estabilidade da matéria corante de morango e mirtilo e (ii) o efeito da microencapsulação por *spray-drying* e por liofilização na estabilidade da cor.

Material e Métodos

Matéria-prima: Os morangos (*Fragaria* × ananassa cv fortuna) foram adquiridos num supermercado local. Os mirtilos (*Vaccinium myrtillus* L.) foram fornecidos pela empresa Fresh Factor, Portugal. As amostras foram congeladas até serem utilizadas.

Extração: Extração sólido/liquido em água destilada na proporção 1:5 à temperatura ambiente durante 25 minutos a 5000 rpm (Sigma & Laborzentrifugen, 2k15). A amostra foi filtrada (Whatman® 41) e o sobrenadante recolhido.

Microencapsulação: A 400mL de extracto aquoso dos frutos foram adicionados 200mL de solução aquosa de inulina a 30%. A solução foi desidratada por *spray-drying* (LabPlant, modelo SD-05) (Beirão-da-Costa *et al.*, 2013) e por liofilização (Telstar LyoQuest).

Avaliação da cor: A cor CIELab dos extractos foi avaliada utilizando um colorímetro Minolta Chroma Meter CT-310 e dos microencapsulados com um colorímetro Minolta Chroma Meter CR-310.

Determinação do teor de antocianinas totais: Método de pH diferencial (adaptado de Wroslstad, 1976).

Avaliação da termo-estabilidade: Os extratos foram submetidos a diferentes binômios tempo/temperatura (temperatura a variar de 50 a 100°C durante intervalos de tempo de 18 a 120 minutos) de acordo com uma matriz fatorial composta. As amostras foram avaliadas quanto à cor e ao teor de antocianinas totais.

Avaliação da foto-estabilidade: Os extratos ou microcápsulas foram colocados em tubos de ensaio e mantidos a uma intensidade luminosa de 0,014 W.m⁻² a 25°C em câmara climática (Fitoclima 750 E – Aralab). Foi avaliada a cor e o teor de antocianinas totais nos dias 5, 12, 22 e 29 de exposição à luz.

Morfologia das microcápsulas: A morfologia dos microencapsulados foi observada por SEM (Beirão-da-Costa et.al., 2013).

Análise estatística: Os resultados foram submetidos a análise de variância a um fator (Anova) através do teste de Tukey para um nível de significância de 95%. Os resultados da termo-estabilidade foram analisados pelo Método de Superfícies de Resposta (RSM). Foi utilizado o software, StatisticaTM v8.0 (Statsoft, Inc., 2007).

Resultados e Discussão

Avaliação da termo-estabilidade

No Quadro 1 apresentam-se os modelos que expressam o teor de antocianinas totais (AnT) , a saturação (C*), a tonalidade (h°) e a luminosidade (L) em função dos factores com efeitos significativos das variáveis independentes temperatura e tempo de tratamento. Os modelos obtidos apresentam ajustes adequados, uma vez que as diferenças entre os coeficientes de regressão (r²) e do r² ajustado são inferiores a 0,1. A temperatura revelou ser a variável com efeito mais significativo na estabilidade da cor exercendo efeitos linear e quadrático para a maioria das variáveis dependentes estudadas, tendo o tempo apresentado um efeito menos expressivo. Na Fig 1 verifica-se que, para ambos os extratos, a concentração de antocianinas diminui à medida que a temperatura e o tempo de tratamento aumentam, sendo que temperaturas e tempos mais elevados conduzem a maior degradação. Wang *et al.* (2010) também verificaram que o aumento da temperatura leva a um aumento da degradação de antocianinas. Relativamente à cor observa-se uma diminuição do parâmetro C* (fig. 2) com o aumento da temperatura e do tempo, nos dois extratos, resultando numa cor menos intensa. Quanto ao parâmetro h° (fig. 3) este é mais influenciado pela temperatura e pelo tempo de tratamento no caso do mirtilo do que no morango, ocorrendo uma diminuição à medida que estas as duas variáveis independentes aumentam. Quanto à luminosidade do morango o modelo não ajustou. No mirtilo verifica-se um aumento do parâmetro L com o aumento da temperatura e do tempo (fig. 4), o que evidencia uma perda de cor.

Avaliação da Foto-estabilidade

Como se pode observar na fig. 5 a presença de luz conduz a uma degradação significativa do teor de antocianinas. No extrato do mirtilo verifica-se um decréscimo significativo (p<0,05) do teor de antocianinas nos primeiros 3 dias de exposição à luz, (de 3,39 para 0,41 mg.g⁻¹), tendo-se mantido constante até ao dia 29. No extrato do morango, observa-se uma variação mais gradual do teor de antocianinas ao longo do tempo, tendo-se registado uma diminuição significativa (p<0,05) até ao dia 22 (de 5,01 para 2,05 mg.g⁻¹). Estes resultados estão de acordo com Wang *et al.* (2010) que também verificou que o efeito da luz implica uma diminuição significativa do teor de antocianinas. Relativamente à cor dos extratos verifica-se

que esta é igualmente influenciada pela presença de luz. Ao longo do tempo de exposição, observa-se um aumento do parâmetro L (fig.6) e uma diminuição do parâmetro C* (fig.7), para ambos os extratos, resultando numa descoloração e numa cor menos intensa. O parâmetro h° (fig.8) é pouco afetado pela presença de luz, tendo-se observado uma pequena variação ao longo do tempo. Quanto à microencapsulação, este processo causa alterações na cor original dos extratos provocando um aumento do parâmetro L e uma diminuição dos parâmetros C* e h°. Os microencapsulados de morango liofilizado mostraram uma boa estabilidade à luz mantendo-se os parâmetros da cor praticamente constantes ao longo do tempo de exposição, conservando a sua cor original. Jiménez-Aguilar, *et al.* (2011), também verificou uma boa estabilidade da cor à luz em microencapsulados de mirtilo por *spray-drying*.

Morfologia das microcápsulas

Os processos de microencapsulação por liofilização e *spray-drying* originaram microcápsulas com morfologias distintas. As microcápsulas obtidas por liofilização (fig. 8) apresentam uma forma esférica e uma superfície rugosa de aspeto esponjoso, observando-se ainda a formação de aglomerados. As microcápsulas obtidas por *spray-drying* (fig. 9), apresentam uma forma esférica, oca, com uma superfície lisa, de parede continua sem fissuras. Observa-se, igualmente, que algumas das microcápsulas formadas exibem uma parede enrugada e com concavidades. Não se observa a aglomeração de partículas. Beirão-da-Costa, *et al.* (2013) observaram morfologias semelhantes em microcápsulas de inulina com óleo de orégão obtidas por *spray-drying*.

Conclusões

A cor e o teor de antocianinas totais dos extratos aquosos de morango e mirtilo são significativamente degradados na presença de luz e quando sujeitos a elevadas temperaturas. O microencapsulamento altera significativamente a cor original dos extratos. No entanto, os microencapsulados mantiveram a cor ao longo do tempo de exposição à luz, contrariamente ao que se verifica nos extratos aquosos. A microencapsulação afigura-se promissora para a utilização de corantes naturais em alimentos processados pelo calor e/ou expostos à luz.

Referências

- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Januário M. I. N., Vicente, A. A., Beirão-da-Costa, M. & Delgadillo, I. 2013. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil. *Food Hydrocolloids*. 33:199-206.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M., Rodríguez, J. A. & Galán-Vidal, C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 113:859-871.
- Cavalcanti, N. R., Santos, T. D. & Meireles, A. A. M. 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Research International*. 44:499–509.
- Galanakis, C. M. 2015. *Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques*. Academic Press, New York.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R. & Meybeck, A. 2011. Global food losses and Food waste. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1-23.
- Jiménez-Aguilar, D. M., Ortega-Regules, A. E., Lozada-Ramírez, J. D., Pérez-Pérez, M. C. I., Vernon-Carter, E. J. & Welti-Chanes, J. 2011. Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:889-894.

Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Assadpoor E & Dehnad, D. 2016. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatina. *International Journal of Biological Macromolecules*. 85:379-385.

Pegg, R. B. & Shahidi, F. 2007. Encapsulation, Stabilization, and Controlled Release of Food Ingredients and Bioactives. p. 509-568. In: Rahman, M. S, *Handbook of Food Preservation*. CRC Press, New York.

Pintado, M. E. & Teixeira, J. A. 2015. Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia*. 2:10-12.

Wang, B. C., He, R. & Li, Z. M. 2010. The Stability and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Blueberry. *Food Technology and Biotechnology*. 48:42-49.

Wrosstad, E. R. 1976. Color and Pigment Analyses in Fruit Products. Oregon State University Agricultural Experiment Station bulletin. 624:1-17.

Quadro 1. Equações dos modelos ajustados aos valores experimentais para o teor de antocianinas totais (AnT) e parâmetros da cor (L,C*,h°) de morango (Mo) e mirtilo (Mi) em função da temperatura e tempo.

Equação polinomial do modelo			r^2	r^2_{ajust}
Mo	AnT	$27,30 - 8,28T - 3,81T^2 - 4,35t - 3,59Tt$	0,93	0,89
	C*	$58,89 - 9,19T - 3,03T^2 - 4,14t + 1,67t^2 - 4,30Tt$	0,97	0,95
	h°	$57,62 - 1,87T - 2,03t$	0,81	0,70
Mi	AnT	$37,41 - 21,54T - 7,14T^2 - 9,72t + 5,83t^2 - 7,44Tt$	0,99	0,99
	C*	$65,96 - 9,85T - 6,69T^2 - 4,60t - 5,57Tt$	0,93	0,87
	h°	$41,64 - 5,51T - 1,32T^2 - 2,52t + 1,63t^2$	0,97	0,96
	L	$35,46 + 8,22T + 4,39T^2 + 1,45t + 2,22Tt$	0,97	0,95

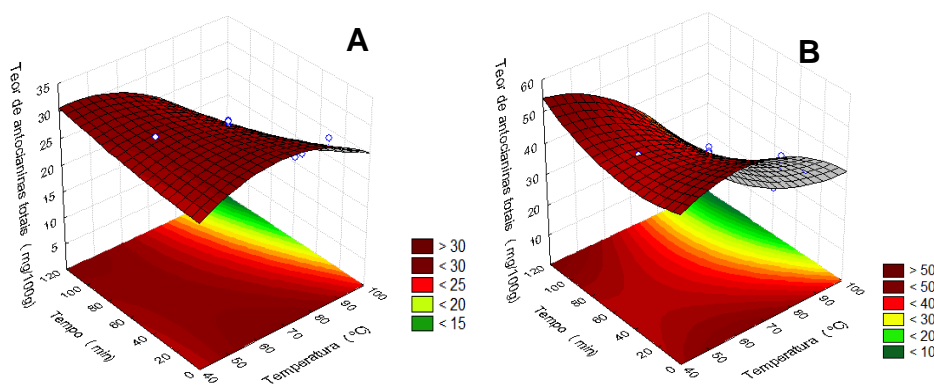


Figura 1. Superfície resposta para o teor de antocianinas totais em função da temperatura e tempo de tratamento: (A) morango e (B) mirtilo.

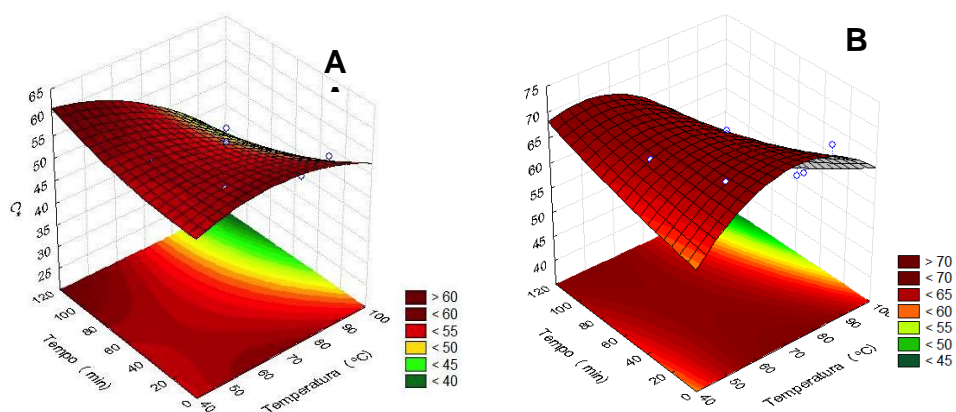


Figura 2. Superfície resposta para o parâmetro C^* em função da temperatura e tempo de tratamento: (A) morango e (B) mirtilo

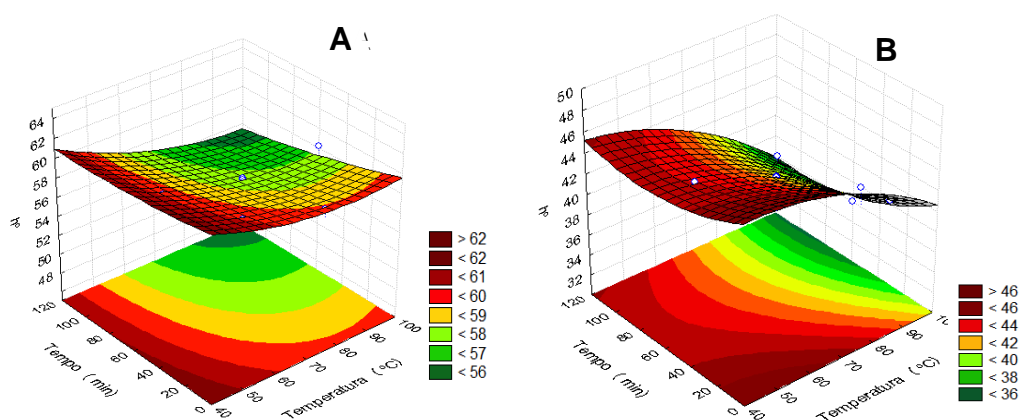


Figura 3. Superfície resposta para o parâmetro h° em função da temperatura e tempo de tratamento: (A) morango e (B) mirtilo

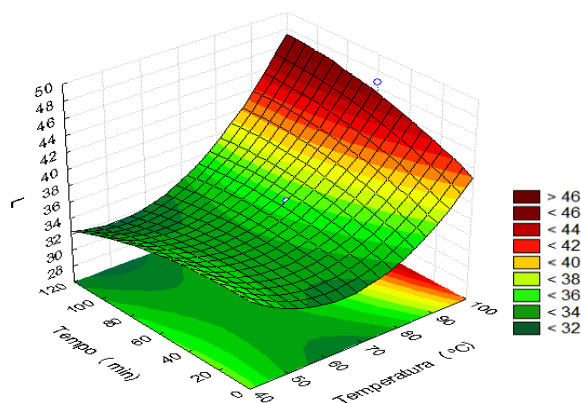


Figura 4. Superfície resposta para o parâmetro L em função da temperatura e tempo de tratamento para o extrato de mirtilo

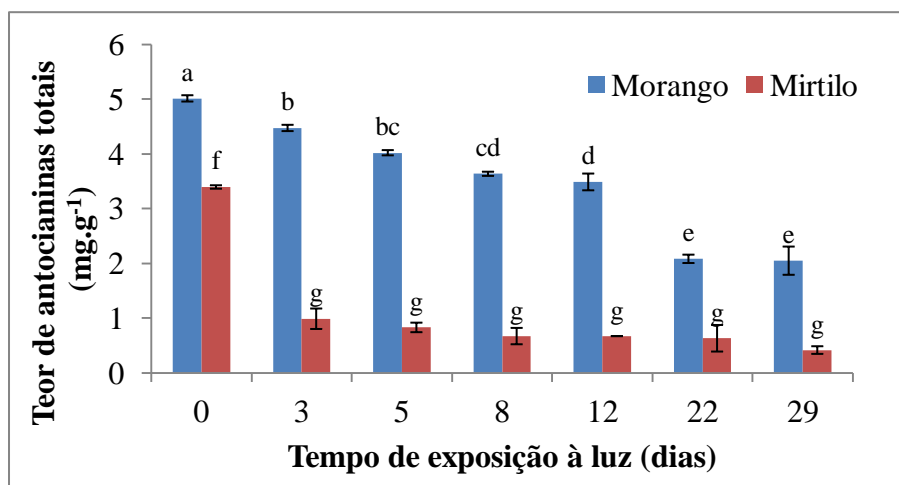


Figura 5. Variação do teor de antocianinas totais ao longo do tempo de exposição à luz. Valores médios \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

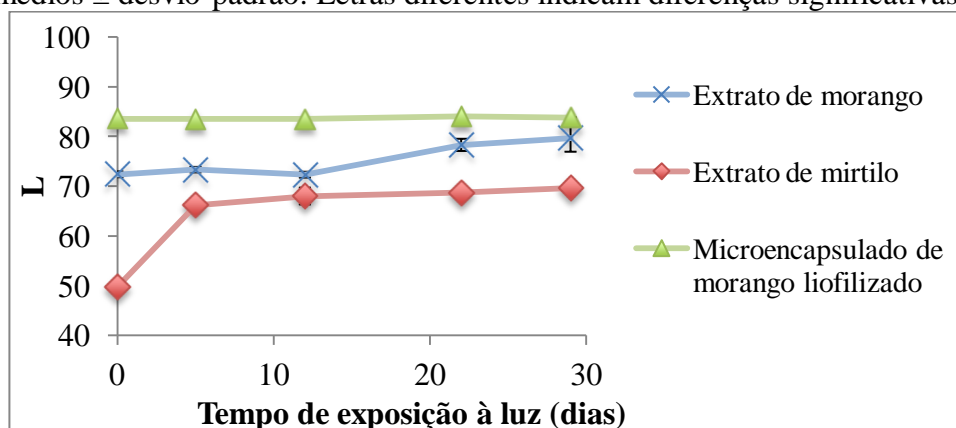


Figura 6 - Variação do parâmetro L dos extratos de morango e mirtilo ao longo do tempo de exposição à luz. Valores médios \pm desvio-padrão.

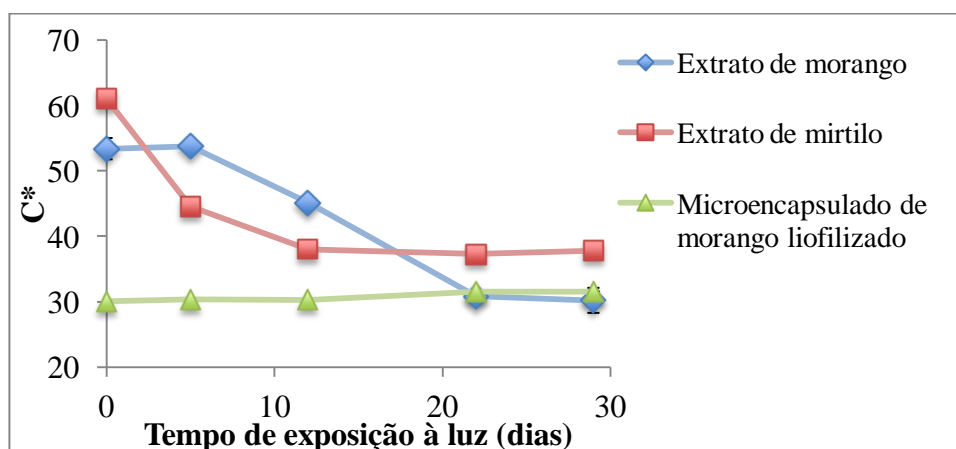


Figura 7. Variação do parâmetro C* dos extratos de morango e mirtilo ao longo do tempo de exposição à luz. Valores médios \pm desvio-padrão.

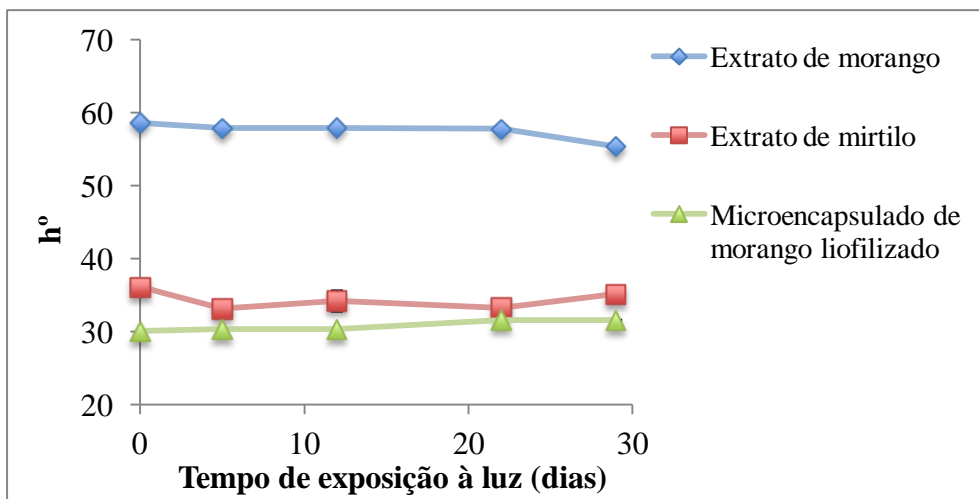


Figura 8. Variação do parâmetro h° dos extratos de morango e mirtilo ao longo do tempo de exposição à luz. Valores médios \pm desvio-padrão.

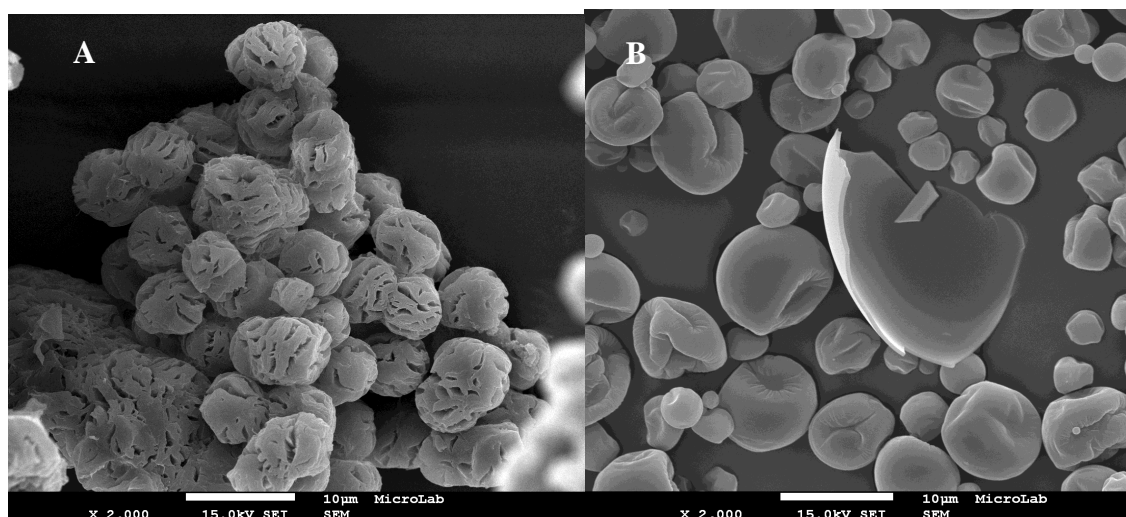


Figura 9. Imagens obtidas por SEM das microcápsulas formadas por liofilização (A) e por *spray-drying* (B) (ampliação X2000).

Anexo II

1. Resultados do processo de extração de antocianinas

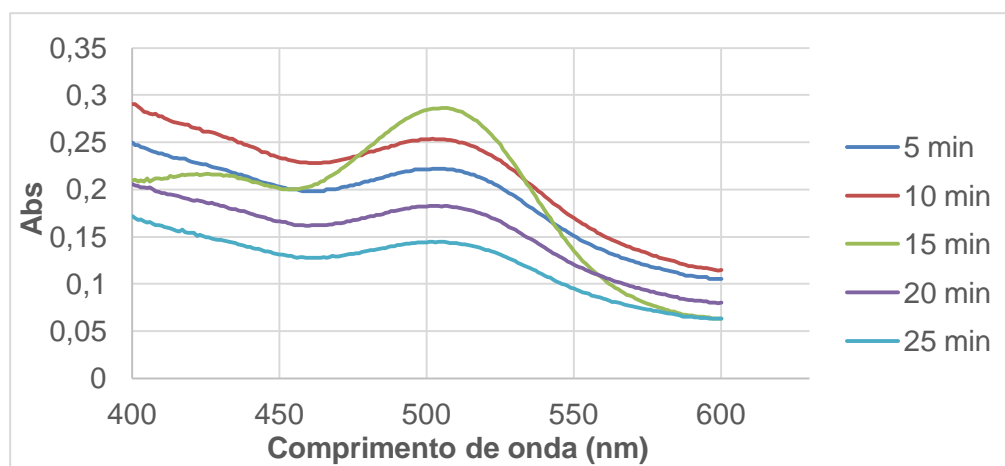


Figura 1 – Varrimento a 500 nm dos extratos de morango em função do tempo de extração para o processo de extração em banho ultrassons

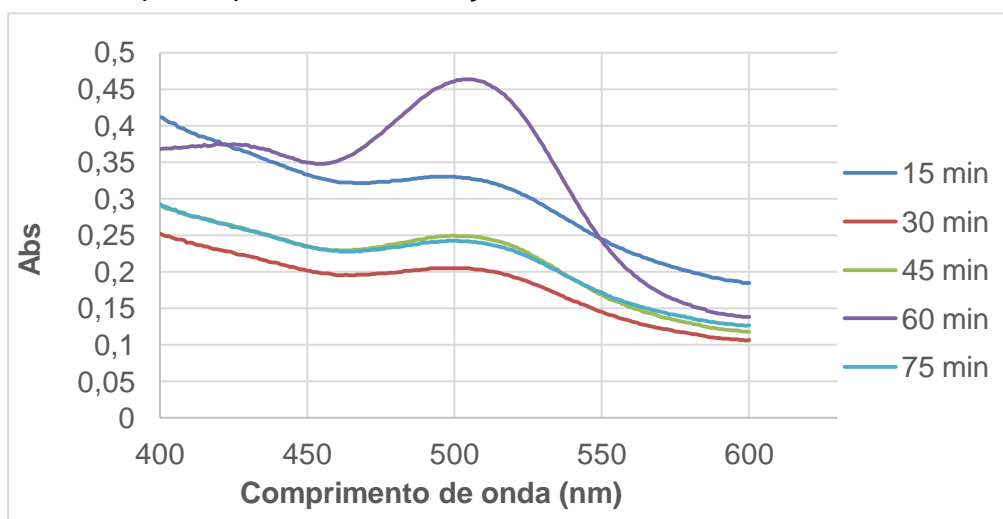


Figura 2 – Varrimento a 500 nm dos extratos de morango em função do tempo de extração para o processo de extração em banho-maria (T=40°C)

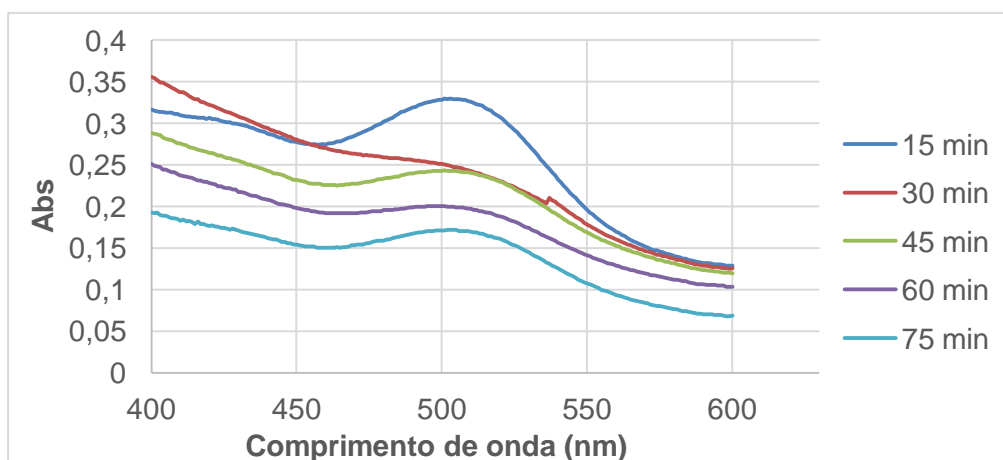


Figura 3 – Varrimento a 500 nm dos extratos de morango em função do tempo de extração para o processo de extração em placa magnética à temperatura ambiente

Anexo III

1. Resultados dos ensaios de termo-estabilidade

Tabela 1 – Resultados dos efeitos lineares, quadráticos e de interação (T,t) para o teor de antocianinas totais e para os parâmetros da cor (C*, h° e L) para os extratos aquosos de morango (a: efeitos com p<0,05)

Fator	Teor de antocianinas totais		C*		h°		L	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
Interseção	27,30	0,0000 ^(a)	52,89	0,0000 ^(a)	57,62	0,0000 ^(a)	66,82	0,0000 ^(a)
T	-8,28	0,0000 ^(a)	-9,19	0,0000 ^(a)	-1,87	0,0038 ^(a)	1,53	0,1622
T²	-3,81	0,0040 ^(a)	-3,03	0,0021 ^(a)	0,92	0,0996	1,37	0,2192
t	-4,35	0,0013 ^(a)	-4,14	0,0002 ^(a)	-2,03	0,0021 ^(a)	-0,75	0,4681
t²	0,57	0,5621	1,67	0,0364 ^(a)	0,34	0,4954	1,49	0,1693
Tt	-3,59	0,0256 ^(a)	-4,30	0,0016 ^(a)	-0,62	0,3857	1,18	0,4213

Tabela 2 – Resultados dos efeitos lineares, quadráticos e de interação (T,t) para o teor de antocianinas totais e para os parâmetros da cor (C*, h° e L) para os extratos aquosos de mirtilo (a: efeitos com p<0,05)

Fator	Teor de antocianinas totais		C*		h°		L	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
Interseção	37,41	0,0000 ^(a)	65,96	0,0000 ^(a)	41,64	0,0000 ^(a)	35,46	0,0000 ^(a)
T	-21,54	0,0000 ^(a)	-9,85	0,0000 ^(a)	-5,51	0,0000 ^(a)	8,22	0,0000 ^(a)
T²	-7,14	0,0000 ^(a)	-6,69	0,0004 ^(a)	-1,32	0,0064 ^(a)	4,39	0,0000 ^(a)
t	-9,72	0,0000 ^(a)	-4,60	0,0033 ^(a)	-2,52	0,0000 ^(a)	1,45	0,0346 ^(a)
t²	5,83	0,0000 ^(a)	0,740	0,5427	1,63	0,0013 ^(a)	-1,25	0,0619
Tt	-7,44	0,0000 ^(a)	-5,57	0,0083 ^(a)	-0,60	0,2603	2,22	0,0249 ^(a)

Tabela 3 – Parâmetros da cor e teor de antocianinas totais dos extratos aquosos de morango em função da temperatura e do tempo de tratamento

Variáveis	Cor			Teor de antocianinas totais (mg.g ⁻¹ r.s.)
	L ^(a)	C ^{*(a)}	h ^{o(a)}	
t0	70,07 ± 0,18	57,09 ± 0,36	59,79 ± 0,11	4,39
50°C/60 min	67,43 ± 0,17	56,70 ± 0,59	59,80 ± 0,18	4,45
57°C/18 min	67,61 ± 0,11	56,60 ± 0,28	59,80 ± 0,05	4,16
57°C/102 min	66,50 ± 0,16	56,79 ± 0,41	58,27 ± 0,12	4,02
75°C/60 min	64,15 ± 0,32	52,77 ± 1,01	57,24 ± 0,06	3,93
75°C/60 min	66,68 ± 0,07	53,87 ± 0,33	57,26 ± 0,13	3,74
75°C/60 min	66,29 ± 0,17	52,82 ± 0,32	56,87 ± 0,07	3,89
75°C/60 min	67,13 ± 0,30	53,58 ± 0,52	58,03 ± 0,08	3,91
75°C/60 min	68,60 ± 0,10	51,52 ± 0,31	58,16 ± 0,07	3,89
75°C/60 min	68,24 ± 0,20	52,72 ± 0,19	58,00 ± 0,07	4,05
75°C/60 min	66,60 ± 0,23	52,94 ± 0,34	57,73 ± 0,04	3,90
75°C/120 min	67,85 ± 0,06	51,13 ± 0,33	57,05 ± 0,06	3,86
93°C/18 min	67,53 ± 0,08	52,91 ± 0,20	57,90 ± 0,03	3,54
93°C/102 min	68,78 ± 0,30	44,50 ± 0,07	55,13 ± 0,11	2,70
100°C/60 min	70,17 ± 0,06	42,20 ± 0,13	58,16 ± 0,13	2,27

^(a) Valores médios ± desvio padrão

Tabela 4 – Parâmetros da cor e teor de antocianinas totais dos extratos aquosos de mirtilo em função da temperatura e do tempo de tratamento

Variáveis	Cor			Teor de antocianinas totais (mg.g ⁻¹ r.s.)
	L ^(a)	C ^{*(a)}	h ^{o(a)}	
t0	33,95 ± 0,26	68,54 ± 0,05	45,63 ± 0,07	5,07
50°C/60 min	33,91 ± 0,62	67,11 ± 0,20	44,72 ± 0,17	4,66
57°C/18 min	33,03 ± 0,56	67,83 ± 0,20	44,78 ± 0,00	4,78
57°C/102 min	32,59 ± 0,44	64,68 ± 0,24	43,60 ± 0,06	4,54
75°C/60 min	35,16 ± 0,20	62,55 ± 0,18	41,91 ± 0,17	3,66
75°C/60 min	35,32 ± 0,14	62,34 ± 0,17	41,66 ± 0,11	3,57
75°C/60 min	35,40 ± 0,08	61,75 ± 0,23	41,50 ± 0,15	3,71
75°C/60 min	35,90 ± 0,33	63,24 ± 0,14	41,72 ± 0,09	3,92

75°C/60 min	34,70 ± 0,17	62,61 ± 0,24	41,85 ± 0,09	3,79
75°C/60 min	36,24 ± 0,11	62,20 ± 0,44	41,32 ± 0,12	3,80
75°C/60 min	35,48 ± 0,05	62,03 ± 0,30	41,51 ± 0,16	3,74
75°C/120 min	35,55 ± 0,23	61,06 ± 0,11	41,02 ± 0,09	3,70
93°C/18 min	38,10 ± 0,06	61,17 ± 0,29	40,56 ± 0,09	3,45
93°C/102 min	42,10 ± 0,05	47,43 ± 0,29	38,17 ± 0,13	1,73
100°C/60 min	46,68 ± 0,16	44,65 ± 0,19	36,07 ± 0,15	1,55

^(a) Valores médios ± desvio padrão

Anexo IV

1. Resultados dos ensaios de foto-estabilidade

Tabela 5 – Parâmetros da cor e teor de antocianinas totais dos extratos aquosos de morango em função do tempo de exposição à luz. Valores médios \pm desvio padrão

Tempo (Dias)	Cor			Teor de antocianinas totais (mg.g ⁻¹) Base seca
	L	C*	h°	
0	72,37 \pm 0,59	53,37 \pm 0,63	58,63 \pm 0,09	5,01 \pm 0,06
3	72,26 \pm 0,31	53,22 \pm 0,45	57,81 \pm 0,30	4,47 \pm 0,06
5	73,31 \pm 0,55	53,76 \pm 0,80	57,86 \pm 0,09	4,02 \pm 0,05
8	74,36 \pm 0,75	48,71 \pm 0,41	58,86 \pm 0,08	3,63 \pm 0,04
12	72,30 \pm 0,58	45,13 \pm 0,30	57,93 \pm 0,22	3,49 \pm 0,15
22	78,29 \pm 0,33	30,79 \pm 0,91	57,79 \pm 0,16	2,08 \pm 0,08
29	79,66 \pm 0,76	30,23 \pm 0,91	55,35 \pm 0,47	2,05 \pm 0,26

Tabela 6 – Parâmetros da cor e teor de antocianinas totais dos extratos aquosos de mirtilo em função do tempo de exposição à luz. Valores médios \pm desvio padrão

Tempo (Dias)	Cor			Teor de antocianinas totais (mg.g ⁻¹) Base seca
	L	C*	h°	
0	49,77 \pm 0,29	61,04 \pm 0,18	36,12 \pm 0,21	3,39 \pm 0,03
3	50,95 \pm 0,25	47,30 \pm 0,73	38,39 \pm 0,85	0,99 \pm 0,19
5	66,16 \pm 0,84	44,55 \pm 0,31	33,12 \pm 0,37	0,83 \pm 0,09
8	68,91 \pm 0,29	37,30 \pm 0,93	37,68 \pm 0,18	0,67 \pm 0,15
12	68,00 \pm 0,69	38,02 \pm 0,59	34,21 \pm 0,46	0,67 \pm 0,00
22	68,68 \pm 0,31	37,29 \pm 0,12	33,26 \pm 0,19	0,63 \pm 0,24
29	69,68 \pm 0,73	37,80 \pm 0,48	35,14 \pm 0,67	0,41 \pm 0,07

Anexo V

1. Resultados da análise por LC-MS/MS

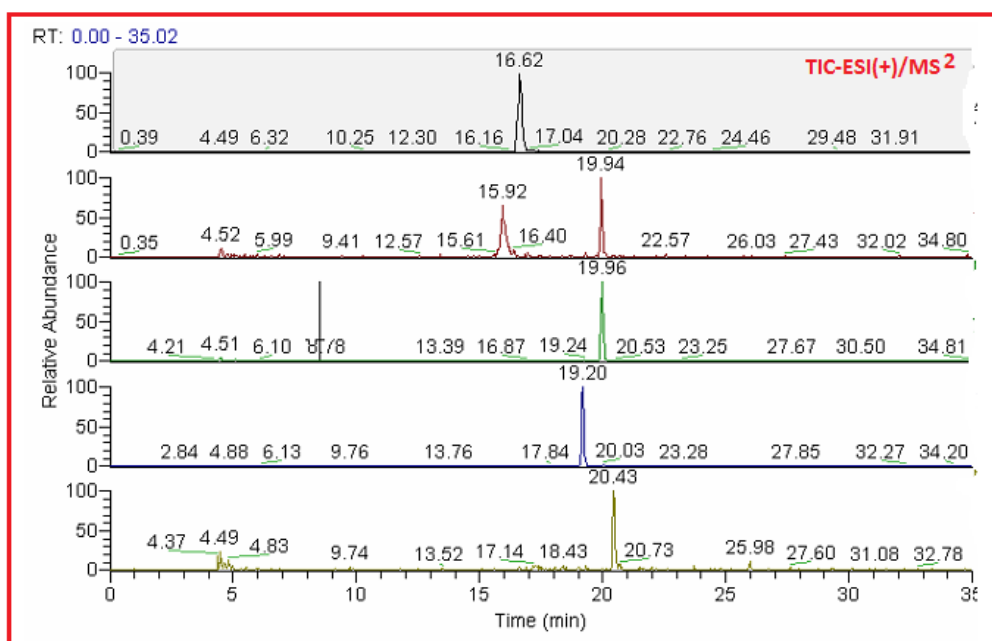


Figura 4 – Cromatogramas iônicos totais para as antocianidinas identificadas no extracto de morango (T0) obtido por ESI(+)/MS

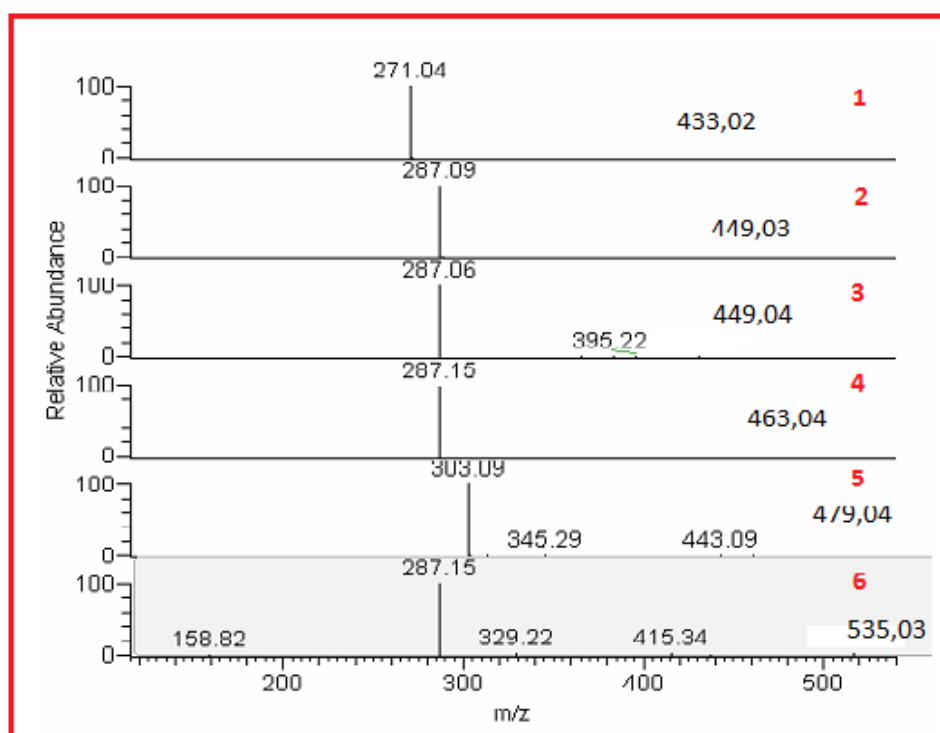


Figura 5 – Espectros ESI(+)/MS² das principais antocianidinas identificadas no extrato de morango (T0). 1) pelargonidina-3-O-glucose (m/z 433 \rightarrow 271); 2) e 3) cianidina-3-O-glucose isómeros (m/z 449 \rightarrow 287); 4) cianidina-ferúlica (m/z 463 \rightarrow 287); 5) delphinidina-ferúlica (m/z 479 \rightarrow 303); 6) cianidina-3-O-malonil-glucose (m/z 535 \rightarrow 287)

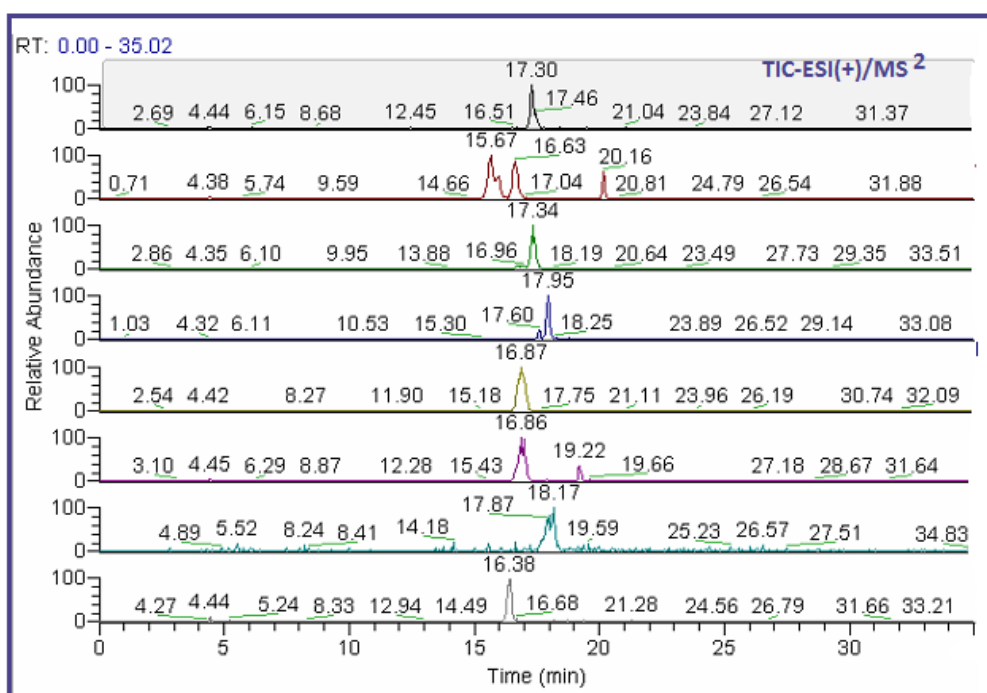


Figura 6 – Cromatogramas iônicos totais para as antocianidinas identificadas no extrato de mirtilo (T0) obtido por ESI(+)/MS

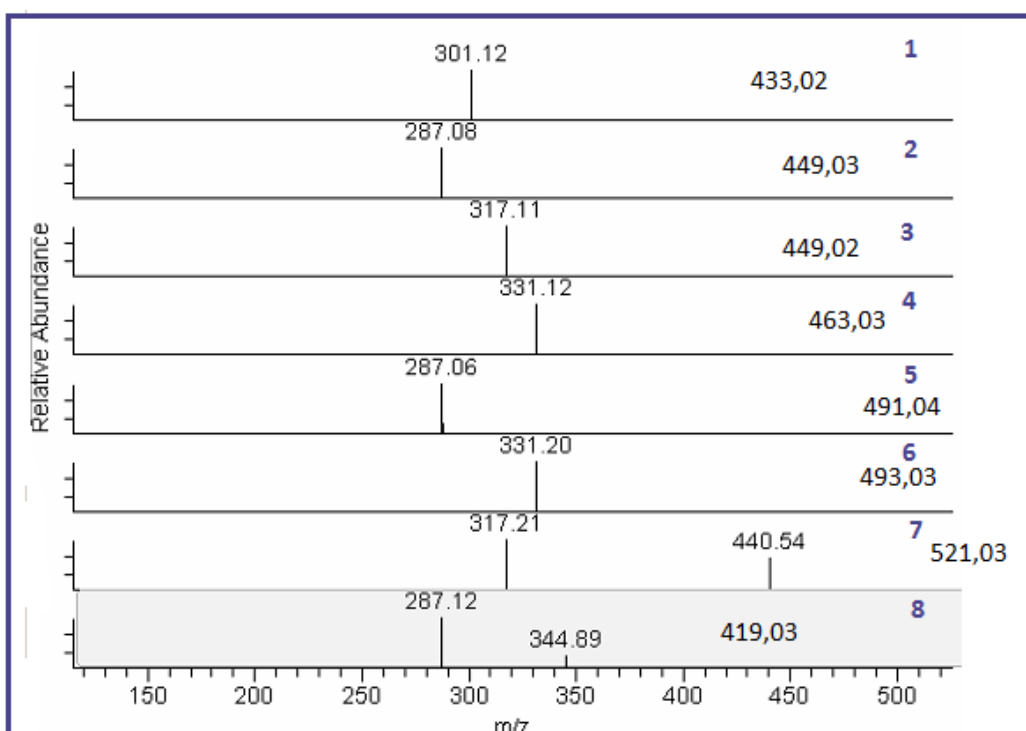


Figura 7 – Espectros ESI(+)/MS² das principais antocianidinas identificadas no extrato de mirtilo (T0). 1) peonidina-3-O-pentose (m/z 433 \rightarrow 301); 2) cianidina-3-O-glucose (m/z 449 \rightarrow 287); 3) petunidina-3-O-pentose (m/z 449 \rightarrow 317); 4) malvidina-3-O-pentose (m/z 463 \rightarrow 331); 5) cianidina-3-O-acetil-monoglucósido (m/z 491 \rightarrow 287); 6) malvidina-3-O-glucose (m/z 493 \rightarrow 331); 7) petunidina-3-O-acetil-monoglucósido (m/z 521 \rightarrow 317); 8) cianidina-3-O-pentose (m/z 419 \rightarrow 287)

Anexo VI

1. Resultados do teor de compostos fenólicos totais, teor de antocianinas totais e da atividade antioxidante (FRAP e DPPH)

Tabela 7 - Teor de compostos fenólicos totais, teor de antocianinas totais e atividade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH dos extratos aquosos, dos liofilizados e dos microencapsulados de morango. Valores médios \pm desvio padrão, exceto o EC₅₀ e IAA

Parâmetros		Extrato aquoso	Liofilizado	Microencapsulado	
				Liofilizado	Atomizado
Teor de compostos fenólicos totais (mg A.G.g ⁻¹ de r.s.)		17,01 \pm 1,10	11,67 \pm 1,02	13,82 \pm 0,23	12,40 \pm 0,08
Teor de antocianinas totais (mg pelargonidina-3-glucósido.g ⁻¹ de r.s)		6,81 \pm 0,53	3,99 \pm 0,07	3,75 \pm 0,00	3,61 \pm 0,16
Atividade antioxidante	FRAP (μ mol.g ⁻¹ de r.s.)	172,50 \pm 5,03	111,32 \pm 4,55	126,59 \pm 1,09	122,50 \pm 4,37
	EC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	3,33	9,79	6,97	7,00
	IAA	0,0114	0,0039	0,0055	0,0054

Tabela 8 - Teor de compostos fenólicos totais, teor de antocianinas totais e atividade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH dos extratos aquosos, dos liofilizados e dos microencapsulados de mirtilo. Valores médios \pm desvio padrão, exceto o EC₅₀ e IAA

Parâmetros		Extrato aquoso	Liofilizado	Microencapsulado liofilizado
Teor de compostos fenólicos totais (mg A.G.g ⁻¹ de r.s.)		13,07 \pm 1,29	7,87 \pm 1,01	7,64 \pm 0,52
Teor de antocianinas totais (mg malvidina-3-glucósido.g ⁻¹ de r.s)		5,95 \pm 0,51	2,69 \pm 0,37	2,04 \pm 0,67
Atividade antioxidante	FRAP (μ mol.g ⁻¹ de r.s.)	125,31 \pm 9,52	73,77 \pm 2,94	69,57 \pm 3,04
	EC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	14,71	21,10	23,75
	IAA	0,0026	0,0018	0,0016